



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Diseño de un biosensor para la detección de arsénico

Diana Paola Tamayo Figueroa

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería

Bogotá D.C., Colombia

2015

Diseño de un biosensor para la detección de arsénico

Diana Paola Tamayo Figueroa

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ingeniería Ambiental (Modalidad investigación)

Director (a):

Pedro Filipe de Brito Brandão, Ph.D.

Codirector (a):

Catalina Arévalo Ferro, Ph.D.

Línea de Investigación:

Microbiología Ambiental y Aplicada.

Grupo de Investigación:

Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente
(GERMINA) - Departamento de Química, Facultad de Ciencias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería

Bogotá D.C., Colombia

2015

*Dedico este trabajo a mis Padres, mi Familia
y a Santiago por creer en mí, por motivarme y
ser mi apoyo incondicional.*

Agradecimientos

Agradezco a mi director Pedro Filipe de Brito Brandão, quien con su guía, conocimiento, apoyo, paciencia y perseverancia me colaboró en cada uno de los retos y desafíos que se me presentaron durante este largo camino.

A mi Co-directora la Dra. Catalina Arévalo Ferro quien con su guía, consejos y colaboración me permitió definir la metodología a seguir desde un comienzo.

Al grupo de Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias, a mis compañeros del laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada y al grupo *GERMINA*, en especial a Lorena Novoa, Carlos Ayala, Andrés León, Sergio Latorre y Ángela García por sus valiosos consejos en cuanto a metodología, desarrollo y a su apoyo incondicional en todos y cada uno de los momentos de este proyecto.

Al Dr. Erik Gullberg del equipo competidor ante iGEM de la Universidad de Uppsala quien amablemente nos permitió el acceso a las cromoproteínas empleadas como genes reporteros.

A la Dra. Jenny Dussan por permitirnos el acceso al plásmido pUC18, el cual fue parte fundamental para el correcto desarrollo de este trabajo.

Al profesor Cesar Sierra y al laboratorio de carnes del ICTA quienes colaboraron con la realización de este proyecto al permitirme el acceso a los equipos para realizar las mediciones de color y fluorescencia.

A la Universidad Nacional y la DIB, que mediante el proyecto de apoyo a posgrados 19095 financió parte de este trabajo.

A Colciencias, que mediante el contrato RC No. 454 - 2011 financió parte de este trabajo de investigación y me dio apoyo económico como estudiante de Maestría.

Resumen

El arsénico (As) es un metaloide causante de diferentes tipos de enfermedades incluyendo el cáncer. La Organización Mundial de la Salud recomienda un límite máximo de 10 µg As/L en agua potable. En Colombia, aún es escasa la información sobre el potencial riesgo de contaminación por As, siendo reportada su presencia principalmente en los departamentos de Caldas, Nariño y Tolima. Los métodos para la detección del elemento son costosos, demorados y difíciles de implementar, por lo que el diseño de biosensores es de gran potencial ya que son sistemas económicos, sensibles y de fácil manejo. El presente trabajo reporta el desarrollo de tres biosensores para la detección de As en aguas, utilizando cromoproteínas como sistema reportero. Se amplificó y secuenció regiones codificantes del gen regulador *arsR* de 15 cepas nativas y 11 clones metagenómicos de ambientes en Colombia, todas resistentes a arsénico. Las secuencias obtenidas mostraron una estrecha relación con los genes *arsR* de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (identidad del 99%, $E=2e-64$) y *Escherichia coli* ST540 (identidad del 100%, $e=0.0$). El ensamblaje de los tres biosensores se realizó utilizando el vector de clonación pUC18, el gen *arsR* del clon metagenómico M19 y en cada uno una cromoproteína como sistema reportero (morada, rosada o amarilla). Los biosensores BASmor y BASama presentaron una respuesta lineal entre la intensidad de color o fluorescencia (proteína reportera) producida respecto a la concentración de As(III), permitiendo una evaluación cualitativa y cuantitativa, respectivamente. Se obtuvieron límites de detección de 75 µg As(III)/L en el caso de evaluación por color y de 7,5 µg As(III)/L en el caso de la respuesta por fluorescencia. El biosensor BASros, bajo las condiciones de estudio, no mostró una respuesta dependiente entre concentración de As(III) y color. Estos biosensores se perfilan como alternativa para evaluar la presencia de As en municipios donde no es posible acceder con otras tecnologías, permitiendo detectar y determinar la prevalencia del metaloide en Colombia.

Palabras clave: Arsénico, biosensor, cromoproteína, gen *arsR*, operon *ars*, ingeniería genética.

Abstract

Arsenic (As) is a metalloid that causes different kinds of diseases including cancer. The World Health Organization recommends a limit in drinking water of 10 µg As/L. In Colombia, the information about the potential risk for As contamination is still scarce, and its presence is reported mainly in Caldas, Nariño and Tolima departments. Accurate measurement of arsenic in drinking water requires expensive methods, sophisticated instrumentation and trained staff. Consequently, the biosensors design represent a great potential because they are cheap, sensitive and user-friendly systems. This work reports the development of three biosensors for arsenic detection in water using chromoproteins as the reporter system. Coding regions of the *arsR* regulatory gene of 15 native strains and 11 metagenomic clones resistant to arsenic from environments in Colombia were amplified and sequenced. The obtained sequences showed a close relationship with the *arsR* genes of *Bacillus cereus* ATCC 14579 (identity of 99 %, $E=2e-64$) and *Escherichia coli* ST540 (identity of 100 %, $e=0.0$). Three biosensors were assembled using the pUC18 cloning vector, the *arsR* gene of the metagenomic clone M19 and each one a chromoprotein as a reporter system (purple, pink or yellow). The biosensors BASmor and BASama showed a linear response between the intensity of colour or fluorescence (reporter protein) produced over the As(III) concentration allowing, respectively, a qualitative and quantitative assessment of the metalloid in aqueous solutions. Detection limits of 75 µg As(III)/L were obtained for the colour evaluation and 7.5 µg As(III)/L for the fluorescence response, respectively. The third biosensor BASros, under the evaluated conditions, did not show a relationship between As concentration and the colour intensity. These biosensors are emerging as an alternative to assess the presence of As in municipalities where there is no access to other technologies, allowing to detect and determine the prevalence of the metalloid in Colombia.

Keywords: Arsenic, biosensor, chromoprotein, *arsR* gene, *ars* operon, genetic engineering

Contenido

	<u>Pág.</u>
Resumen	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas	XIV
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 Arsénico	4
1.1.1 Toxicidad.....	4
1.1.2 Distribución a nivel mundial.....	6
1.1.3 Situación en Colombia	7
1.1.4 Métodos para la detección y remoción de arsénico	8
1.2 Resistencia bacteriana al arsénico.....	9
1.2.1 Metabolismo microbiano del arsénico	9
1.2.2 Genes involucrados en la resistencia a arsénico: Operon <i>ars</i>	11
1.2.3 Gen y proteína <i>arsR</i> /ArsR	12
1.3 Biosensores.....	14
1.3.1 Principios generales de los biosensores microbianos.....	16
1.3.2 Biosensores para la detección de arsénico	18
1.3.3 Genes reporteros	25
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GENERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1 Microorganismos	33
3.2 Medios de cultivo	34
3.3 Amplificación y secuenciación de regiones que codifican para el regulador ArsR de bacterias autóctonas de Colombia resistentes a arsénico	34
3.3.1 Reactivación de bacterias resistentes a arsénico y extracción de ADN	36
3.3.2 Diseño de <i>primers</i>	36
3.3.3 Amplificación y secuenciación del gen <i>arsR</i> y promotor	37
3.4 Ensamblaje de los constructos del gen <i>arsR</i> con el gen reportero.....	39
3.4.1 Selección del gen <i>arsR</i> para ensamblaje del biosensor.....	40
3.4.2 <i>Upstream part</i> : preparación del gen <i>arsR</i> para ensamblaje	42
3.4.3 <i>Downstream part</i> : selección y preparación de cromoproteínas como gen reportero para ensamblaje	43
3.4.4 Vector de clonación.....	44
3.4.5 Ensamblaje de biosensores utilizando cromoproteínas como genes reporteros.....	44

3.5 Evaluación a nivel de laboratorio de los biosensores ensamblados a distintas concentraciones de As	47
3.5.1 Preparación del cultivo.	48
3.5.2 Selección de condiciones de cultivo para ensayos a diferentes concentraciones de As con los biosensores BASmor y BASros: evaluación cualitativa.	48
3.5.3 Evaluación colorimétrica de los biosensores BASmor y BASros bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio.....	50
3.5.4 Evaluación de fluorescencia del biosensor BASama bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1 Amplificación y secuenciación de regiones que codifican para el regulador <i>arsR</i> de clones metagenómicos y bacterias autóctonas de Colombia resistentes a arsénico	52
4.1.1 Amplificación y secuenciación de regiones que codifican para el regulador <i>arsR</i> del cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada, Universidad Nacional de Colombia	52
4.1.2 Identificación gen <i>arsR</i> de <i>Escherichia coli</i> en clones metagenómicos	60
4.2 Diseño de un biosensor para la detección de arsénico a través del ensamblaje de constructos del gen <i>arsR</i> con un gen reportero	64
4.2.1 Expresión basal de los genes reporteros	64
4.2.2 Características del gen <i>arsR</i> seleccionado para ensamblaje	66
4.2.3 Ensamblaje de los biosensores para la detección de arsénico utilizando cromoproteínas como sistema reportero	71
4.3 Evaluación de los biosensores ensamblados a nivel de laboratorio y con distintas concentraciones de As	75
4.3.1 Selección de condiciones de cultivo para ensayos con el biosensor BASmor a diferentes concentraciones de As: evaluación cualitativa	76
4.3.2 Evaluación colorimétrica de los biosensores BASmor y BASros bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio	82
4.3.3 Evaluación de fluorescencia del biosensor BASama bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio	95
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	101
5.1 Conclusiones	101
5.2 Recomendaciones y Perspectivas	102
ANEXO A: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....	103
ANEXO B: PROTOCOLOS.....	109
ANEXO C: PLÁSMIDOS.....	116
ANEXO D: PARTICIPACIÓN EN EVENTO CIENTÍFICO – MODALIDAD ORAL	133

Lista de figuras

Figura 1-1 Analogía química estructural entre el ión fosfato y el ión arsenato.	5
Figura 1-2. Posibles interacciones del arsénico con las células procariotas.	10
Figura 1-3. Operón <i>arsR</i> de <i>E. coli</i> , plásmido R773.....	12
Figura 1-4 Union del As(III) al represor ArsR plásmidico de <i>E. coli</i> R773	14
Figura 1-5. Plataformas de biosensores bacterianos diseñados.....	17
Figura 1-6. Representación de un circuito básico de un biosensor para la detección de arsénico.....	18
Figura 1-7. Estructuras químicas de los cromoforos de las proteínas tipo-GFP:.....	30
Figura 1-8 . Biomasa celular de <i>E. coli</i> expresando algunas de las cromoproteínas de la colección creada por el equipo de la Universidad Uppsala-2012.....	31
Figura 3-1. Procedimiento general utilizado para la amplificación y secuenciación de los genes <i>arsR</i> que codifican para el regulador ArsR de las bacterias autóctonas de Colombia.	35
Figura 3-2. Metodología general para el ensamblaje del biosensor.	40
Figura 3-3. Procedimiento general utilizado para evaluar los biosensores ensamblados para la detección de arsénico.....	47
Figura 4-1. Colección de “regulogs” de la familia de factores transcripcionales para el gen <i>arsR</i>	56
Figura 4-2. Análisis blastn obtenido con la secuencia consenso de la PCR realizada con los primers Bacillusesp para las cepas CESAR 4 y CESAR 11.	58
Figura 4-3. Análisis blastn obtenido con la secuencia consenso de la PCR realizada con los primers Ecolimetag para las cepas SH, SK, SL,C7, C12,C13,M22 Y E21.....	58
Figura 4-4. Árbol filogenético realizado con la secuencia <i>arsR</i> del genero <i>Bacillus</i> sp obtenida en este estudio..	59
Figura 4-5. Electroforesis en gel de agarosa 1% de ADN total de los clones metagenómicos amplificados con el par de <i>primers</i> Ecolimetag.....	61
Figura 4-6. Análisis por SSCP de los productos de PCR (genes <i>arsR</i>)	62
Figura 4-7. Análisis blastx de la secuencia consenso del gen <i>arsR</i> obtenida con los fragmentos de ADN de las bandas cortadas del gel de SSCP	63
Figura 4-8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de la amplificación del gen <i>arsR</i> y promotor, presentes en clones metagenómicos, utilizando ADN obtenido a partir de bandas extraídas del gel de SSCP	64
Figura 4-9. Expresión de cada una de las cromoproteínas utilizadas en este trabajo como genes reporteros, después de 24 h de incubación.	66

Figura 4-10. Selección de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pSB1T3-BBa_J044450 que confiere resistencia a tetraciclina.....	67
Figura 4-11. Análisis blast con el gen <i>arsR</i> metagenómico de 920 pb.....	69
Figura 4-12. Análisis blast con el gen <i>arsR</i> metagenómico de 689 pb.....	70
Figura 4-13 Mapeo en el genoma de <i>E. coli</i> K12 con la secuencia del gen <i>arsR</i> de 920 pb del recombinante denominado <i>E. coli</i> TOP10-arsRTet5.....	71
Figura 4-14. Mapas de los plásmidos construidos con pUC18 + gen <i>arsR</i> (de 920 pb) + cromoproteína reportera.....	74
Figura 4-15. Electroforesis de gel de agarosa 1 % de la digestión enzimática de los biosensores BASmor, BASama y BASros ensamblados.....	75
Figura 4-16. Evaluación cualitativa de BASmor descrita en la sección 3.5.2 - Ensayo A.78	
Figura 4-17. Evaluación cualitativa del biosensor BASmor descrita en la sección 3.5.2 - Ensayo B.....	80
Figura 4-18. Ensayo cualitativo del biosensor BASmor descrito en la sección 3.5.2 - Ensayo C.....	81
Figura 4-19. Espacio de color del sistema CIE-L*a*b*.....	83
Figura 4-20. Cambio de color del biosensor BASmor bajo diferentes concentraciones de As(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	85
Figura 4-21. Evaluación colorimétrica del biosensor BASmor en diferentes concentraciones de As(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	85
Figura 4-22. Cambio de color del biosensor BASmor bajo diferentes concentraciones de As(V) después de 24 h de incubación a 37°C en oscuridad.....	88
Figura 4-23. Evaluación colorimétrica del biosensor BASmor en diferentes concentraciones de As(V) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	88
Figura 4-24. Cambio de color del biosensor BASmor bajo diferentes concentraciones de Sb(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	89
Figura 4-25. Evaluación colorimétrica del biosensor BASmor en diferentes concentraciones de Sb(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	89
Figura 4-26. Cambio de color del biosensor BASros bajo diferentes concentraciones de As(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	92
Figura 4-27. Evaluación colorimétrica del biosensor BASros en diferentes concentraciones de As(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	92
Figura 4-28. Cambio de color del biosensor BASros bajo diferentes concentraciones de As(V) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	93
Figura 4-29. Evaluación colorimétrica del biosensor BASros en diferentes concentraciones de As(V) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	93
Figura 4-30. Evaluación colorimétrica del biosensor BASros en diferentes concentraciones de Sb(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.....	94
Figura 4-31. Fluorescencia emitida por el cultivo de <i>E.coli</i> -BASama en medio LBA después de 24 h de incubación a 37 °C en 7500 µg/L de As(III).....	96
Figura 4-32 Evaluación de la fluorescencia emitida por el biosensor BASama en diferentes concentraciones de As(III) después de 4 h de inducción a 37 °C, 200 rpm y en oscuridad.....	96

Figura 4-33 Evaluación de la fluorescencia emitida por el biosensor BASama (ensayo con células conservadas a -80 °C) en diferentes concentraciones de As(V) después de 4 h de inducción a 37 °C, 200 rpm y en oscuridad..	97
Figura 4-34. Evaluación de la fluorescencia emitida por el biosensor BASama (ensayo con células sin conservar a -80 °C) en diferentes concentraciones de As(V) después de 4 h de inducción a 37 °C, 200 rpm y en oscuridad.....	98
Figura 4-35 Evaluación de la fluorescencia emitida por el biosensor BASama en diferentes concentraciones de Sb(III) después de 4 h de inducción a 37 °C, 200 rpm y en oscuridad.....	99

Lista de tablas

Tabla 1-1. Características de los biosensores de arsénico con sus límites de detección, periodos de inducción y limitantes.	21
Tabla 1-2. Genes reporteros comúnmente utilizados para el diseño de biosensores.	26
Tabla 3-1. <i>Primers</i> diseñados para la amplificación del gen <i>arsR</i>	37
Tabla 3-2. Composición de la reacción de PCR para la amplificación del gen <i>arsR</i>	38
Tabla 3-3. Programas de PCR para la amplificación del gen <i>arsR</i> de distintos grupos de microorganismos.	38
Tabla 4-1. Genes de resistencia al arsénico identificados en las cepas del Cesar y de la Sabana de Bogotá.	52
Tabla 4-2. Genes de resistencia al arsénico identificados en los clones obtenidos de estudio Metagenómico pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada.	54

INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un elemento químico altamente distribuido en la naturaleza y se puede liberar al medio ambiente por procesos naturales (Duker *et al.*, 2005; Hughes, 2002) y antropogénicos como por ejemplo la minería y quema de carbón (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 2007; Han *et al.*, 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo considera como uno de los contaminantes inorgánicos más tóxicos en el agua potable (WHO, 2011; Yunus *et al.*, 2011). A nivel mundial se han reportado numerosos casos de intoxicación por el consumo de aguas subterráneas con arsénico en países como Bangladesh, Vietnam, Taiwán, China, EE.UU, Argentina entre otros (Alonso *et al.*, 2014; Callejas, 2007; Ng *et al.*, 2003). En los últimos años se ha hallado As en aguas de consumo en catorce de los veinte países de América Latina, situación que indica la falta de estudios acerca de la presencia de este contaminante (MERCOSUR, 2013). La población en riesgo estimada en el continente latinoamericano supera las 14 millones de personas con cientos de casos comprobados en países como Chile y Argentina (Alonso *et al.*, 2014; Bundschuh *et al.*, 2012; Esparza, 2006; Litter, 2009).

Algunas de las tecnologías analíticas actualmente implementadas para medir arsénico son la absorción atómica – generación de hidruros, absorción atómica con horno de grafito, espectroscopia de emisión, espectrometría de masas atómica de fluorescencia, cromatografía líquida acoplada a masas (Litter, 2009). Estas técnicas de detección y cuantificación de As en aguas generalmente son costosas, de larga duración, difíciles de implementar tanto a nivel de laboratorio como en campo, debido a que requieren personal y equipos especializados y requieren un muestreo cuidadoso para poder mantener la integridad de la muestra. Por otro lado, una de las metodologías analíticas para la detección de As en muestras ambientales y en campo es el uso de kits que se basan en la reacción de “Gutzeit”. Sin embargo, algunas de sus desventajas son los

interferentes (sulfuro, telurio y selenio), los falsos positivos, los falsos negativos y su baja reproducibilidad y precisión (EPA, 2004).

Por estas razones se ha visto la necesidad de desarrollar metodologías para la detección de As en tiempo real, que sean portables, sensibles y de bajo costo. Así, grupos de investigación alrededor del mundo han propuesto métodos alternativos para la medición del elemento utilizando sistemas biológicos como los biosensores y bioreporteros (D'Souza, 2001; Hu *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2005; Luong *et al.*, 2008; Merulla *et al.*, 2013; Ramanathan *et al.*, 1998; Silver *et al.*, 2005; Stocker *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2008). Estos sistemas se caracterizan por tener bajos límites de detección desde 4 µg/L, como por ejemplo el biosensor diseñado por (Stocker *et al.*, 2003), ser portables y con periodos de inducción o tiempo de respuesta hasta máximo 24 h, como por ejemplo el biosensor basado en cambios de pH diseñado por (de Mora *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta la fecha los biosensores diseñados presentan algunas desventajas que varían de acuerdo al sistema reportero empleado (Kaur *et al.*, 2015). Por ejemplo, una desventaja general es la necesidad de utilizar equipos para poder medir la respuesta emitida (biosensores con luminiscencia y fluorescencia) y la necesidad de adicionar sustratos como el IPTG y cromógenos costosos al medio de cultivo para obtener una respuesta. Adicionalmente en algunos casos se han observado respuestas no lineales (Stocker *et al.*, 2003), o interferencias con iones bicarbonato y falsos positivos (de Mora *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2009). Es por esto que el diseño de un biosensor que permita la detección visual del As sin necesidad de equipos costosos o adición de sustratos al medio se perfila como una potencial solución a las desventajas nombradas anteriormente.

En Colombia, las investigaciones con relación a la presencia de arsénico en aguas de consumo y aguas subterráneas son escasas. En la Universidad Nacional de Colombia el Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente (G.E.R.M.I.N.A.) ha realizado estudios acerca de la presencia del As en el país (Alonso, 2014; Carrillo, 2012; Latorre, 2014; Muñoz, 2008; Torres, 2008). Las investigaciones de Torres (2008) y Carrillo (2012) permitieron establecer un cepario de bacterias resistentes a As y se identificaron los genes correspondientes a la bomba transportadora de arsénico (ArsB), a la enzima arsenato reductasa (ArsC) y a la enzima arsenito oxidasa (AroA). Carrillo (2012) reportó 16 cepas con la presencia del gen *arsB* que codifica para la ArsB. Por otro lado, en el grupo de investigación se utilizó la metagenómica para buscar los

genes involucrados en la resistencia a As de las comunidades bacterianas endémicas de distintos ambientes de la sabana de Bogotá (Latorre, 2014), obteniendo como resultado 11 clones con resistencia a arsenato de sodio e identificando en todos ellos la presencia de la bomba transportadora de arsénico (ArsB).

En el país hasta la fecha no se tiene conocimiento de un reporte sobre el diseño y construcción de un biosensor para la detección de arsénico, siendo que este se perfila como una solución de bajo costo y que puede ser utilizada en lugares del país donde no es posible emplear tecnologías más robustas y costosas para detectar este contaminante ambiental. Los biosensores desarrollados en este trabajo son los primeros construidos en el país para la detección de As utilizando genes autóctonos de Colombia y son los primeros en utilizar cromoproteínas como sistema reportero para la detección de este metaloide. Una de las principales ventajas de los constructos diseñados es la producción del reportero (color/fluorescencia) sin la necesidad de adicionar sustratos al medio de cultivo, lo que hace que este sistema sea aún más económico.

De los tres constructos diseñados, dos tienen como respuesta un cambio de color visible respecto a la concentración de arsénico, lo cual permite realizar una determinación de ausencia/presencia del contaminante en muestras acuosas, convirtiendo este sistema en una alternativa portátil. Por otro lado, el tercer biosensor tiene como respuesta la emisión de fluorescencia, que es proporcional a la concentración de As en la muestra, y por lo tanto se puede realizar una cuantificación del metaloide. Estos biosensores son la propuesta inicial para obtener una herramienta económica, sencilla y portátil que permita la detección de este metaloide en las aguas de consumo de los diferentes municipios del país, en donde la información acerca de la presencia del As es escasa o nula y el presupuesto y personal no permiten realizar otro tipo de análisis.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Arsénico

El arsénico (As) es un elemento químico altamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en diferentes estados de oxidación (-III, 0, III, V) y de forma orgánica (arsenobetaina, trimetilarsina o arsenoazucars) e inorgánica (trivalente como arsenito o arsina y pentavalente como arsenato) (Mandal *et al.*, 2002; Yunus *et al.*, 2011). En la naturaleza se encuentra distribuido en más de 200 diferentes formas minerales, de las cuales aproximadamente el 60 % son arsenatos, 20 % sulfuros y sulfosales y el 20 % restante incluye arseniuros, arsenitos, óxidos, silicatos y arsénico elemental. La abundancia terrestre de arsénico es de alrededor de 1,5 - 3 mg/kg suelo. Se distribuye en la corteza terrestre, suelo, sedimentos, agua, aire y organismos vivos (Mandal *et al.*, 2002).

El arsénico se puede liberar al ambiente de dos formas distintas: a) *Procesos naturales*: como procesos de meteorización, actividad biológica y emisiones volcánicas (Alonso *et al.*, 2014; Duker *et al.*, 2005; Hughes, 2002); y b) *Procesos antropogénicos*: como la minería, efluentes industriales, fundición de metales, quema de carbón y el uso de pesticidas entre otros (ATSDR, 2007; Han *et al.*, 2003).

1.1.1 Toxicidad

Las propiedades tóxicas del arsénico varían según las concentraciones y la forma en que se encuentre, es decir, según su estado físico, estado de oxidación y estructura química. Por ejemplo, los compuestos con arsénico inorgánico trivalente (arsenito) son más tóxicos que aquellos que contienen arsénico pentavalente (arsenato) (Tsai *et al.*, 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA, por sus siglas en inglés, *Environmental Protection Agency*) lo consideran como uno de los contaminantes inorgánicos más tóxicos en el agua potable, teniendo un límite máximo recomendado de 10 µg/L (WHO, 2011; Nordstrom, 2002). Algunos de los síntomas ocasionados por la ingestión de As incluyen los cambios de pigmentación de la piel e hiperqueratosis, hipertensión, diabetes mellitus y desordenes neurológicos. También se encuentra asociado a cáncer de vejiga, hígado, riñón y piel. Generalmente la exposición prolongada al elemento incrementa el riesgo de la morbilidad y abortos (Hughes *et al.*, 2011; Yunus *et al.*, 2011).

El mecanismo microbiano de ingreso del arsénico a la célula varía de acuerdo al estado de oxidación en el que se encuentre el elemento. En el caso del arsenato [As(V)], este puede entrar a la célula gracias a la ayuda de las proteínas transportadoras de fosfato (Pit y Pst) que permiten el ingreso debido a que el fosfato inorgánico es análogo al arsenato (Figura 1-1). Una vez el As (V) se encuentra en la célula este puede competir con el fosfato inorgánico e interferir en los procesos de producción de energía como por ejemplo la fosforilación oxidativa. Adicionalmente, este puede formar nucleótidos y azúcares con arsénico que interferirán con los procesos metabólicos de la célula (Liu *et al.*, 2003; Stolz *et al.*, 2011).

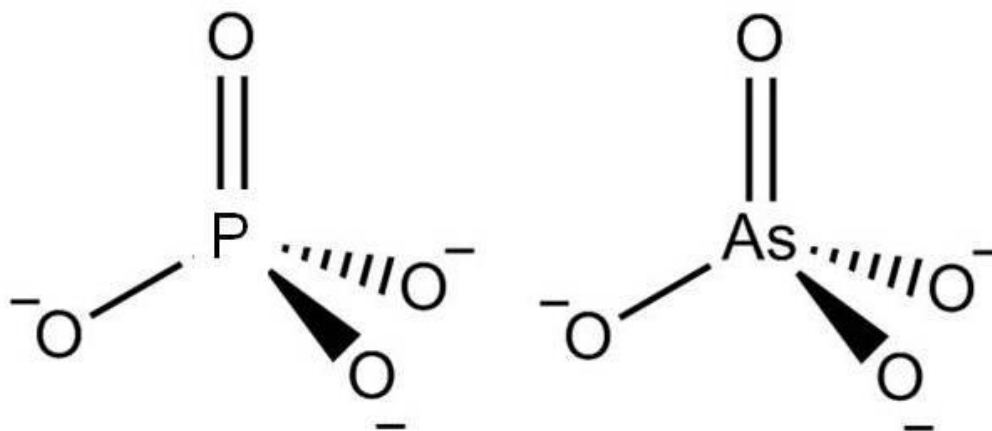


Figura 1-1 Analogía química estructural entre el ión fosfato y el ión arsenato.

Por otro lado, el arsenito [As(III)] ingresa a la célula bacteriana utilizando las aquaglicerol porinas, como la GlpF, ya que este grupo de canales multifuncionales permiten el transporte de solutos orgánicos neutros como glicerol y urea (Liu *et al.*, 2003). El arsenito es transportado debido a que en una solución neutral este predominará y las aquaglicerol porinas lo consideraran como un equivalente inorgánico del glicerol. En el interior de la célula el As(III) se puede unir a grupos tiol que forman parte de proteínas celulares involucradas en el funcionamiento celular, como lo son la piruvato deshidrogenasa y la 2-oxo-glutarato deshidrogenasa (Liu *et al.*, 2003; Stolz *et al.*, 2011). Adicionalmente, este elemento se une a los grupos sulfhidrilo produciendo la degradación de la membrana y la muerte celular debido a la producción de “especies reactivas de oxígeno” (ROS, por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*). En mamíferos actúa como un alterador endocrino uniéndose a los receptores de algunas hormonas e interfiriendo con la señalización celular (Dhuldhaj *et al.*, 2013).

1.1.2 Distribución a nivel mundial

A nivel mundial, la contaminación de aguas subterráneas por As ha sido de gran importancia ya que en países como Bangladesh, Vietnam, India, Nepal, Taiwán, China, Chile, EE.UU, Argentina, entre otros, se han reportado numerosos casos de intoxicación por este metal (Alonso *et al.*, 2014; Callejas, 2007; Hughes *et al.*, 2011; Mandal *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2003; Petrusevsky, 2007; Smith *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Generalmente las poblaciones afectadas son aquellas que se encuentran en países o regiones con bajos niveles de ingresos económicos y por tal motivo no tienen fácil acceso a aguas potables, razón por la cual las comunidades explotan aguas subterráneas para el abastecimiento (Bundschuh *et al.*, 2012; Litter, 2009).

En los últimos años se ha hallado As en aguas de consumo en catorce de los veinte países que conforman América Latina. Esta situación indica la falta de estudios acerca de la presencia de este contaminante en los demás países del continente y no como se podría pensar que, por el contrario, el contaminante se encuentre ausente en los seis países donde no se ha reportado (MERCOSUR, 2013). En la región, se estima que 4,5 millones de personas están crónicamente expuestas a altos niveles de As en el agua de consumo, sobrepasando el valor límite de 50 µg/L establecido por la regulación de muchos países de la región (Esparza, 2006). La población estimada en riesgo supera las

14 millones de personas, con cientos de casos comprobados en países como México, Chile y Argentina (Alonso *et al.*, 2014; Bundschuh *et al.*, 2012; Litter, 2009; Litter *et al.*, 2010).

1.1.3 Situación en Colombia

En el país existen varios estudios realizados, principalmente por el Servicio Geológico Colombiano (Ingeominas), acerca de la geología e hidrogeología del país. En estos estudios se observó la presencia de As generalmente en forma de arsenopirita asociada con filones de metales preciosos en su gran mayoría a lo largo de la cordillera central y occidental Colombiana (INGEOMINAS, 2004; Alonso *et al.*, 2014; Callejas, 2007; Marín, 1978; Wokittel, 1960). Sin embargo las investigaciones con relación a la presencia de arsénico en aguas de consumo y aguas subterráneas son escasas. Se conoce que la contaminación de aguas subterráneas por As afecta principalmente a los departamentos del Tolima y Caldas, ubicados en la cordillera Central, y Nariño en la cordillera Occidental, en donde el arsénico proviene de yacimientos que contienen arsenopirita u otros minerales portadores de trazas de As (Alonso *et al.*, 2014). No obstante, también se han reportado yacimientos de As en los departamentos de Antioquia, Cauca y Norte de Santander (Alonso *et al.*, 2014; Callejas, 2007).

En el reciente artículo de revisión titulado “*Environmental occurrence of arsenic in Colombia: A review*” (Alonso *et al.*, 2014) se muestra una perspectiva más amplia de la distribución del arsénico en el país y se discute sus implicaciones y potenciales riesgos al medio ambiente y la salud humana. Ravenscroft (2007) realizó un estudio de modelación de regiones con riesgo potencial de altos contenidos de arsénico en aguas subterráneas del país. Mediante predicciones basadas en sistemas de información geográfica, se señala que alrededor de 1’664.902 personas, lo que equivale a un 5 % de la población nacional, estarían en riesgo potencial de intoxicación en las zonas montañosas y valles de la región norte del país. Además, Nicolli (2006) señala la existencia de fenómenos de liberación de arsénico asociado a minerales de arsenopirita en cuerpos hídricos de los departamentos de Tolima, Caldas y Nariño, generado por la minería llevada a cabo en esta región del país, principalmente de tipo aurífera.

En Colombia, la minería ha crecido de manera exponencial en los últimos años. Se reporta que el país es el primer productor de carbón en América Latina y el decimo en el mundo; el 40 % del territorio Colombiano está concesionado o solicitado por empresas transnacionales para realizar proyectos de extracción de minerales e hidrocarburos (Ronderos, 2011). Adicionalmente, se han intensificado los procesos de extracción y explotación de oro, plata, platino, molibdeno, níquel, zinc, además de los minerales que abastecen la construcción, como las calizas, arenas y arcilla (Alonso *et al.*, 2014). Estas actividades de explotación conllevan a la posible liberación antropogénica del arsénico a los suelos y fuentes de agua potable, potencializando su contaminación.

En el país, el gobierno decidió acogerse a las recomendaciones internacionales y en la resolución colombiana 2115 de 2007, en la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano en Colombia, se determina que el valor admisible de arsénico es de 0,01 mg/L (Ministerio de la protección social 2007), por lo que se hace necesario el desarrollo y uso de tecnologías económicas, portátiles y sencillas para poder realizar este análisis en cualquier municipio o región del país.

1.1.4 Métodos para la detección y remoción de arsénico

En la actualidad los métodos para la remoción de As se pueden dividir en dos tipos principales (Litter *et al.*, 2010):

- a) *Tecnologías convencionales*: oxidación, coagulación-coprecipitación, adsorción, osmosis inversa e intercambios iónicos;
- b) *Métodos emergentes*: adsorbentes naturales, tecnologías de luz solar y biorremediación.

Para la medición precisa de los bajos niveles de arsénico en el agua potable se requiere una instrumentación e instalaciones caras y sofisticadas, así como personal capacitado. Las técnicas para la detección y cuantificación de arsénico en aguas como lo son la absorción atómica – generación de hidruros, absorción atómica con horno de grafito, espectroscopia de emisión, espectrometría de masas, espectrometría atómica de fluorescencia, cromatografía líquida acoplada a masas entre otras (Litter, 2009), a pesar

que brindan límites de detección muy por debajo de los 10 µg/L, son costosas, requieren de personal capacitado, no son funcionales para un gran número de muestras, requieren mucho tiempo para obtener un resultado y son difíciles de implementar (Luong *et al.*, 2007; Sengupta *et al.*, 2009).

Por estas razones se ha visto la necesidad de desarrollar métodos o técnicas adecuadas para la detección de arsénico en tiempo real, portátiles, sencillas, que tengan la sensibilidad necesaria y un bajo costo. Así, se ha propuesto el diseño de sensores electroquímicos (Gao *et al.*, 2013; Salaün *et al.*, 2012) y biosensores bacterianos como una alternativa viable para este fin (Fuku *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2005; Merulla *et al.*, 2013; Ramanathan *et al.*, 1998; Roberto *et al.*, 2002; Stocker *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar que los sensores electroquímicos se postulan como una alternativa viable debido a sus bajos límites de detección (0,8 – 7,5 ng/L) (Gao *et al.*, 2013; Salaün *et al.*, 2012) son métodos costosos, de procedimientos extensos, tediosos y que aún requieren de personal altamente calificado para su realización (Kaur *et al.*, 2015). Por otro lado, los biosensores bacterianos reportan límites de detección que varían según el reportero empleado, pero en general detectan desde 4 (Stocker *et al.*, 2003) ó 7 µg As(III)/L y son portables y con periodos de inducción o tiempo de respuesta hasta máximo 24 h.

1.2 Resistencia bacteriana al arsénico

Debido a la alta toxicidad de este metaloide los microorganismos han evolucionado para tolerar, disminuir la toxicidad e incluso utilizar las altas concentraciones de este elemento como fuente de energía para su crecimiento.

1.2.1 Metabolismo microbiano del arsénico

En la naturaleza los microorganismos responden al arsénico en diferentes formas, dependiendo tanto de las condiciones físico-químicas del metaloide como del género y especie del microorganismo. Estas respuestas microbianas al elemento pueden ser quelación, compartimentalización, extrusión, inmovilización, entre otros (Figura 1-2).

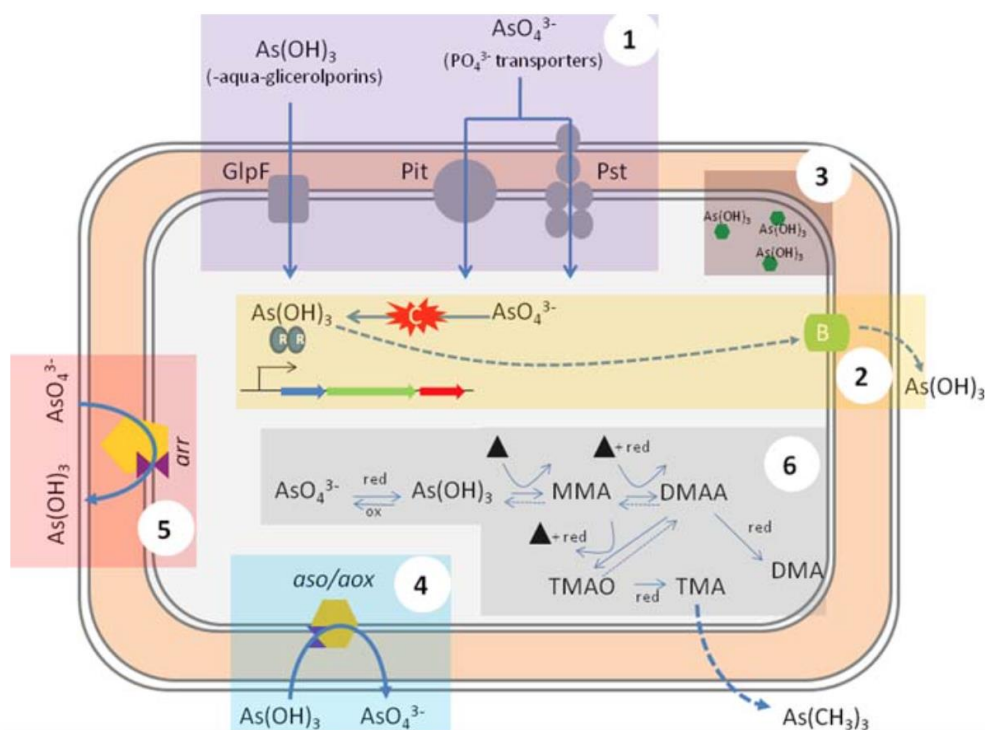


Figura 1-2. Posibles interacciones del arsénico con las células procariotas: 1) As(III) entra a la célula a través de aquagliceroporinas y As(IV) a través de los transportadores de fosfato; 2) Transformación de As en el citoplasma por los productos del operón *ars*; 3) Formación de complejos de As(III) por péptidos ricos en cisteína; 4) Oxidación de arsenito a arsenato; 5) Reducción de arsenato a arsenito por cadena respiratoria; y 6) Metilación de arsénico inorgánico. Tomado de Paez-Espino *et al.* (2009).

El mecanismo más común es aquel en el que el arsénico ingresa a la célula a través de los transportadores que varían de acuerdo al estado de oxidación del elemento (Aquagliceroporinas ó transportadores de fosfato) (Figura 1-2.1). En el interior de la célula el arsenato será reducido a arsenito por una reductasa y posteriormente será eliminado del interior celular por una bomba específica de membrana (Figura 1-2.2). Este es uno de los mecanismos de resistencia más estudiados y se ha reportado que microorganismos como *Sulfurospirillum barnesii*, *Desulfotomaculum auripigmentum*, *Bacillus arsenicoselenatis*, *Chrysiogenes arsenatis*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* y *Wolinella* spp lo realizan (Dhuldhaj *et al.*, 2013). Adicionalmente el As puede ser utilizado para procesos de respiración, donde es empleado como donador o aceptor de electrones (Figura 1-2.4) (Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

Aparte de cambiar los estados de oxidación del elemento, los microorganismos han desarrollado vías metabólicas para metilar las especies inorgánicas o demetilar las orgánicas. Esta metilación ocurre luego de reducir el arsenato a arsenito y posteriormente se realiza la adición de los grupos metilo generando metilarsinas volátiles

(Figura 1-2.6), permitiendo de esta manera la disminución del elemento en matrices como agua y suelo (Paez-Espino *et al.*, 2009).

Existen otro tipo de bacterias como *Pseudomonas arsenitoxidans*, *Thermus aquaticus* y *Thermus thermophilus* (Gihring *et al.*, 2001) que debido a la alta toxicidad del arsenito lo oxidan a arsenato utilizando oxígeno, nitrato o hierro como aceptor final de electrones. Por otro lado, se encuentran las bacterias heterótrofas oxidadoras de arsenito que utilizan una arsenito oxidasa periplasmica para llevar a cabo este proceso (genes *aox*) (Dhuldhaj *et al.*, 2013; Inskeep *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2003).

Finalmente se encuentran los microorganismos que reducen simultáneamente los sulfatos y los arsenatos formando sales de arsénico en el medio, lo cual disminuye la toxicidad del elemento ya que estas sales precipitan disminuyendo su biodisponibilidad (Paez-Espino *et al.*, 2009).

1.2.2 Genes involucrados en la resistencia a arsénico: Operon *ars*

Uno de los sistemas de resistencia al arsénico más estudiados es el del operón *ars* que puede ser encontrado en cromosomas (Carlin *et al.*, 1995), en transposones (Summers, 1992) o en plásmidos (Achour *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 1992; Rosen, 1999). Por lo general este operón consta de tres (*arsRBC*) o cinco genes (*arsRDABC*) organizados en una misma unidad transcripcional (Figura 1-3). La expresión del operón está regulada por la proteína ArsR, la cual en ausencia de As se une con el promotor formando un dímero y previniendo la transcripción. En presencia de arsénico, la afinidad de la ArsR por el operador/promotor disminuye permitiendo que se inicie la transcripción (Wu *et al.*, 1993). Los genes ubicados *downstream* permiten la detoxificación de la célula ya que el ArsD es una chaperona de As(III) encargada de entregarlo a la ATPasa (ArsA) que es la subunidad catalítica de la bomba de extrusión ArsB; adicionalmente, la ArsC es una reductasa que transforma el arsenato en arsenito para que la ArsD lo pueda reconocer (Figura 1-3) (Stolz *et al.*, 2006).

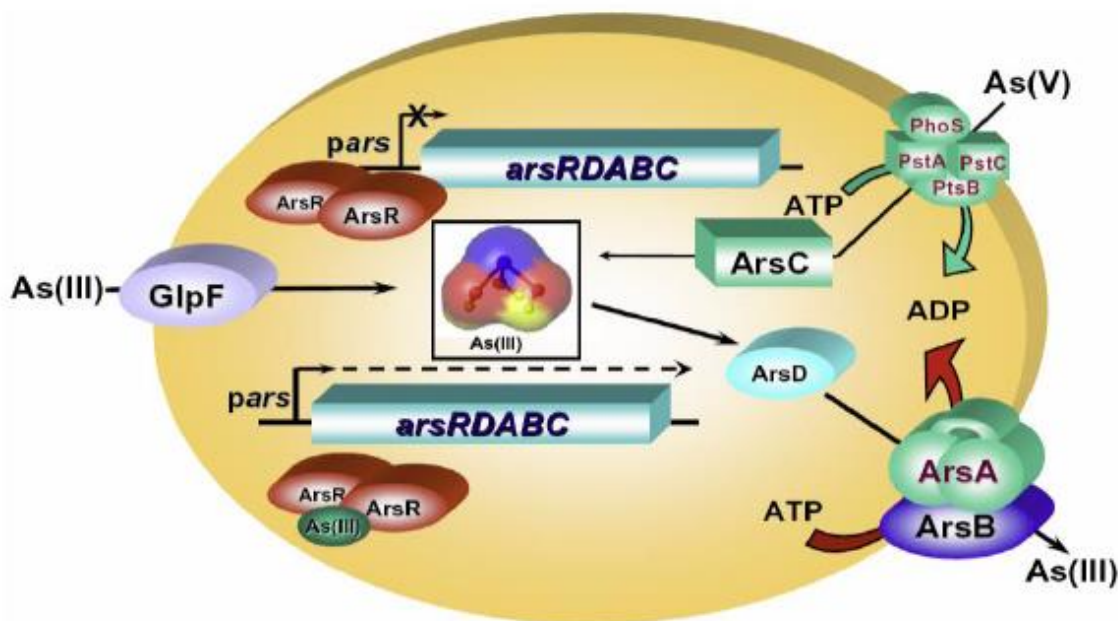


Figura 1-3. Operón *arsR* de *E. coli*, plásmido R773. Tomada de Chen *et al.* (2014).

Debido al sistema de regulación transcripcional llevado a cabo por el gen *arsR* y su promotor, el diseño de biosensores para la detección de arsénico se ha basado en la utilización de este gen junto con diferentes genes reporteros.

1.2.3 Gen y proteína *arsR*/ArsR

La ArsR es una proteína citosólica de aproximadamente 13 kDa (San Francisco *et al.*, 1990), conformada por dos monómeros de aproximadamente 117 residuos aminoacídicos que tienen una alta afinidad por el promotor *arsRDABC* (Shen *et al.*, 2013).

Es miembro de la familia de proteínas metaloreguladoras ArsR/SmtB, conocida por unirse a varios tipos de metales tóxicos (Busenlehner *et al.*, 2003). En general, estos reguladores son conocidos por su pequeño tamaño (12-20 KDa), por los motivos metal-unión, por el dominio *wing-helix* y por la formación de dímeros. Varios residuos de cisteína normalmente median la unión con el metal. La ubicación de estos residuos Cys y los motivos específicos son característicos del metal detectado por el regulador (Busenlehner *et al.*, 2003).

En los estudios realizados por Xu *et al.* (1997) se demuestra que las proteínas ArsR tienen al menos tres dominios altamente conservados (un dominio de unión al metal, un dominio de unión al ADN y un dominio de dimerización) en aproximadamente 80 de los residuos aminoacídicos que la componen. Estas proteínas tienen un “brazo” terminal que coordina los iones pequeños y tiofílicos como As(III) y Sb(III) con tres residuos de cisteína (Busenlehner *et al.*, 2003). Adicionalmente, el sitio de unión es muy específico para el As(III) y puede discriminar eficientemente este metaloide de los iones fosfato, sulfato, cobalto y cadmio (Kostal *et al.*, 2004). En el estudio reportado por Ramanathan *et al.* (1997) se demuestra la alta afinidad que tiene la proteína por el As(III), ya que incluso 10^{-15} M de As(III) podrían inducir el promotor *ars*. En los estudios de Diorio *et al.* (1995) y Shen *et al.* (2013) se demostró que hay una expresión basal del operon *ars* en ausencia de As(III), y que la inducción del mismo no es observable a concentraciones menores de $1\mu\text{g As(III)/L}$.

Como se mencionó en la sección anterior, la proteína ArsR regula la expresión del operón *ars*: esta proteína en ausencia de As se une con el promotor formando un dímero y previniendo la transcripción. Una vez el As(III) ingresa a la célula con ayuda de las aquaglicerolporinas, se une a tres tiolatos en un residuo conservado de cisteína en el motivo Cys³²-Val-Cys³⁴-Asp-Leu-Cys³⁷ (Dominio de unión al ADN) (Chang *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2011) provocando un cambio conformacional (Busenlehner *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2012). De esta manera se disocia la ArsR del operador/promotor de ADN permitiendo la expresión de los genes *ars* (Wu *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1993) (Figura 1-4).

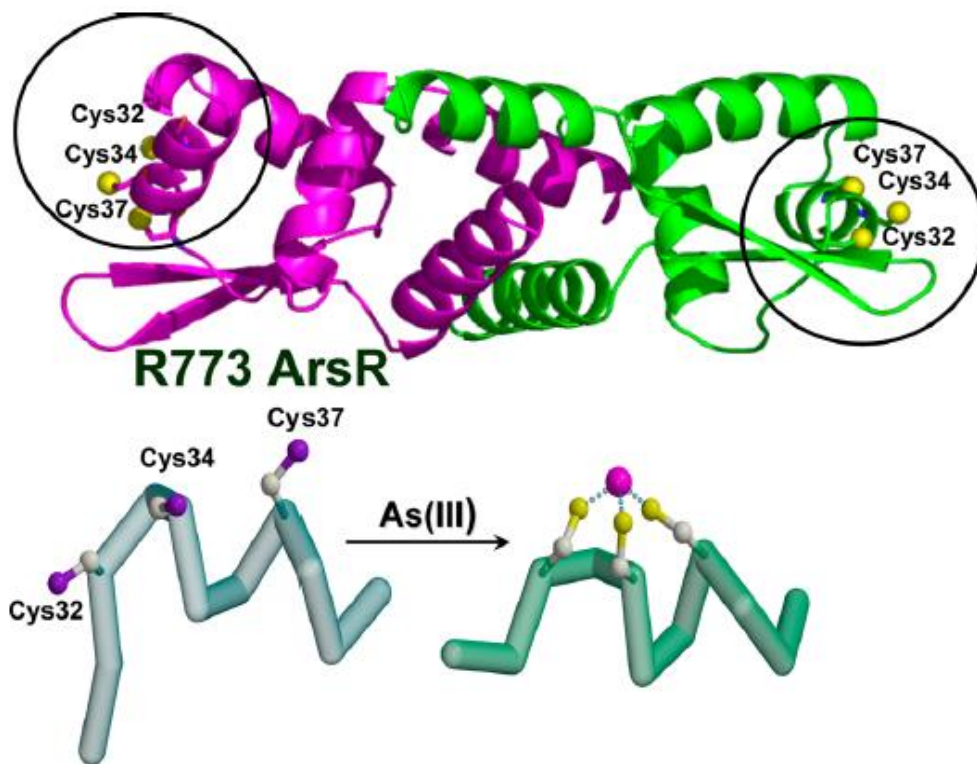


Figura 1-4 Unión del As(III) al represor ArsR plásmidico de *E. coli* R773, lo cual resulta en un cambio conformacional del represor. El As(III) se une a las Cys 32, Cys 34 y Cys 37 del represor ArsR. Al desenrollar la hélice, se interrumpe la unión al ADN, lo que resulta en la disociación del represor desde el sitio operador. La disociación del represor induce la expresión génica (Shen *et al.*, 2013).

Las proteínas ArsR de los plásmidos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tienen únicamente un 30% de similitud en su secuencia pero en ambos tipos de microorganismos son represores sensibles a arsenito, arsenato y antimonio (Cai *et al.*, 1998; Diorio *et al.*, 1995; Rosenstein *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1991).

Los estudios realizados por Xu *et al.* (1996) revelan la secuencia consenso en bacterias Gram-negativas de los sitios de contacto del ADN con el gen; esta secuencia es 5'-TCATNNNNNNNTTTG-3'.

1.3 Biosensores

En la actualidad las nuevas aproximaciones en biología molecular y biología sintética involucran el diseño y generación de partes biológicas nuevas a partir de componentes naturales existentes. Estas partes serán los bloques o bases para la construcción de nuevos sistemas biológicos, redes de sistemas en circuitos génicos, vías metabólicas sintéticas y sistemas de señalización (Arkin, 2008; Checa *et al.*, 2012; Weber *et al.*,

2011). Esta capacidad de diseñar nuevos circuitos y redes ha permitido que en las últimas décadas el diseño y elaboración de biosensores avance de manera continua, es así que se ha propuesto su uso e implementación en diferentes campos como lo son las aplicaciones ambientales (medición de compuestos tóxicos presentes en el ambiente), en la industria alimentaria y de fermentaciones (medición de productos de interés industrial).

Un biosensor es un dispositivo biológico que detecta y transmite información acerca de un cambio fisiológico o bioquímico en el entorno (Figura 1-5.A), siendo un sistema específico, reproducible y sensible que funciona en soluciones opacas y que es portátil (D'Souza, 2001).

Tipos de biosensores:

- *Biosensores microbianos:* Estos biosensores necesitan del crecimiento microbiano para su funcionamiento. Como principales ventajas tienen su bajo costo de diseño, elaboración y producción. Tienen alta estabilidad del producto final comparados con aquellos biosensores que son únicamente proteínas y enzimas. Adicionalmente, los microorganismos son fáciles de manipular y presentan más estabilidad en muestras ambientales (Park et al., 2013). La respuesta a medir en este tipo de sensores está basada en la medición de fluorescencia, luminiscencia, colorimetría y otro tipo de medición de los productos metabólicos de los microorganismos (Dong et al., 2002).
- *Inmovilización en biomateriales:* Este tipo de sensores son altamente selectivos. Sin embargo, una de sus principales desventajas es la necesidad de un proceso de purificación que es tedioso y costoso. En este sistema se pueden emplear diferentes configuraciones de anticuerpos, DNA, RNA, enzimas o proteínas receptoras como elementos sensores. En la presencia de los analitos *target* “diana”, las partes biológicas serán convertidas en una respuesta eléctrica u óptica en proporción a la concentración del analito de interés (Park et al., 2013). En este tipo de biosensores el material biológico se inmoviliza directamente con el transductor, generalmente en membranas o por medio de otras técnicas como adsorción, atrapamiento ó uniones covalentes (D'souza, 1989).

- *Sensores electroquímicos*: son sistemas que ofrecen alta sensibilidad y rápida detección. Las especies electroactivas producidas o consumidas por los microorganismos son monitoreadas por métodos amperometricos, potenciometricos, impedimetricos o conductimetricos (Dong et al., 2002; Luong et al., 2008; Su et al., 2011). Sin embargo, a pesar que se postulan como una alternativa viable debido a sus bajos límites de detección (0,8 – 7,5 ng/L) (Gao et al., 2013; Salaün et al., 2012), son métodos costosos, de procedimientos extensos y tediosos y que aún requieren de personal altamente calificado para su realización (Kaur et al., 2015).

1.3.1 Principios generales de los biosensores microbianos

Desde el estudio realizado por King et al. (1990) en donde se reporta el primer biosensor bacteriano para naftaleno, se ha aumentado el número de biosensores diseñados para monitorear un amplio rango de contaminantes ambientales como lo son los metales pesados, derivados de benceno, pesticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Los microorganismos tienen varias ventajas que les permiten ser utilizados para el diseño y fabricación de biosensores: 1) son capaces de metabolizar un amplio rango de compuestos químicos, 2) permiten de manera relativamente sencilla realizar modificaciones genéticas mediante mutaciones o recombinación de ADN y 3) sirven como una fuente económica de enzimas intracelulares (Castillo et al., 2004; D'Souza, 2001; Rogers, 1995).

El diseño de estos dispositivos está basado en la utilización de un plásmido construido donde los genes que codifican para un gen reportero están ubicados bajo el control de un promotor que reconoce el analito de interés dando como respuesta un cambio medible y cuantificable, por ejemplo, por emisión de luz (Figura 1-5.B) (Checa et al., 2012; Merulla et al., 2013).

Las plataformas de bioreporteros bacterianos consisten básicamente en tres módulos (Figura 1-5) (Checa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013):

1. *Módulo sensor*: es aquel que reconoce la señal y es el responsable de la selectividad y sensibilidad del sensor a ensamblar (Marchisio *et al.*, 2011; van der Meer *et al.*, 2010). Los reguladores que responden a iones de metales pesados y a metaloides son ampliamente usados en el desarrollo de este tipo de biosensores, la mayoría de ellos está basado en dos familias de metaloreguladores MerR y SmtB/ArsR.
2. *Módulo transductor*: Es aquel que transmite la señal detectada al modulo reportero. La interacción de la señal con el modulo sensor afecta la habilidad del modulo de unión al ADN (o regulador transcripcional) para promover o reprimir la transcripción del modulo reportero.
3. *Módulo reportero*: Es aquel que produce la respuesta a medir, como lo son por ejemplo fluorescencia, luminiscencia o color.

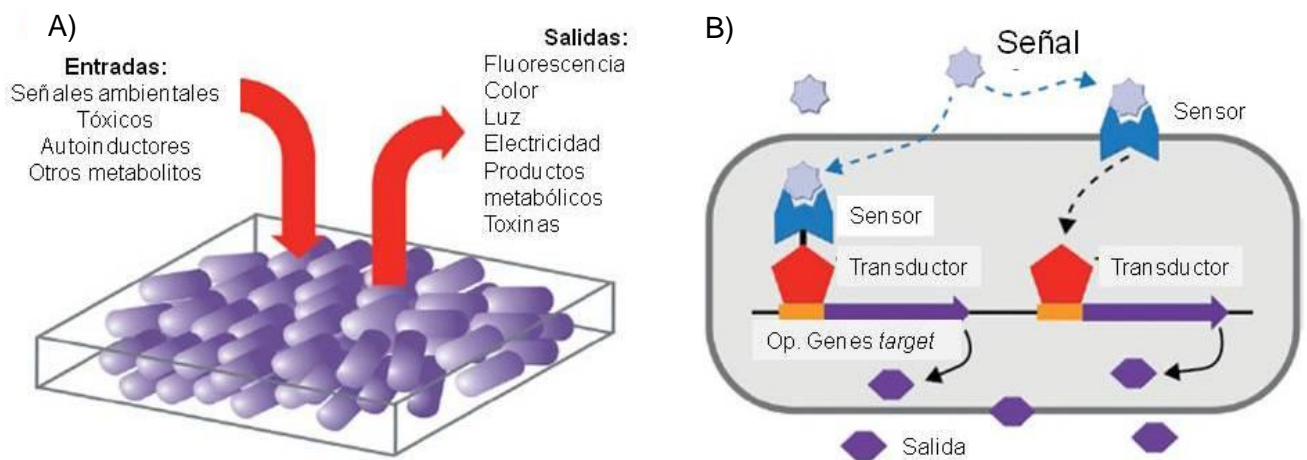


Figura 1-5. Plataformas de biosensores bacterianos diseñados. A) Las bacterias han sido diseñadas para acoplar la detección de una perturbación física o química a la producción de un reportero de salida cuantificable; B) Representación de las dos vías de transducción de señales bacterianas comúnmente utilizadas. Adaptado de Checa *et al.* (2012).

Las dos vías de transducción de señales comúnmente utilizadas en los biosensores bacterianos son (Figura 1-5 B): 1) la proteína del modulo sensor detecta la señal (analito) en el citoplasma y alostericamente modifica el dominio de sitio de unión al ADN con el fin de activar o reprimir la expresión de los reporteros; o 2) un sensor histidina-quinasa unido a membrana que detecta la señal en el medio y las transduce por fosforilación al regulador transcripcional; como resultado se regula la expresión de los genes reporteros.

1.3.2 Biosensores para la detección de arsénico

Debido a la alta toxicidad del arsénico y a los problemas mencionados anteriormente, varios grupos de investigación alrededor del mundo han propuesto métodos alternativos para la medición del arsénico utilizando sistemas biológicos como los biosensores y bioreporteros (Castillo *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2014; de Mora *et al.*, 2011; Merulla *et al.*, 2013).

En el diseño de los biosensores para la detección de arsénico se ha utilizado esencialmente el mecanismo de regulación del gen *arsR* junto con su operador (sección 1.2.3) (Tabla 1-2), unidos a un gen reportero que permite cuantificar la respuesta emitida (Figura 1-6) encontrándose que la cantidad de proteína reportera producida es proporcional a la concentración de arsénico en la muestra (Merulla *et al.*, 2013).

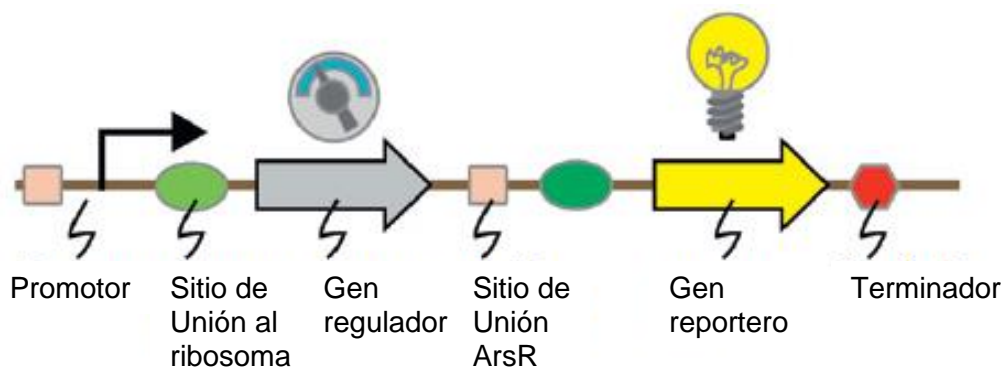


Figura 1-6. Representación de un circuito básico de un biosensor para la detección de arsénico. Adaptado de Merulla *et al.* (2013).

Hasta el momento, los biosensores diseñados para la detección de arsénico Tabla 1-1 han utilizado genes reporteros como *lacZ*, *lux* y *gfp* principalmente. Sin embargo, las desventajas de estos reporteros es que requieren sustratos adicionales y/o ATP para la producción de señal, son más costosos a la hora de implementarlos debido a que necesitan equipos que sean capaces de medir la respuesta emitida y en algunas ocasiones no se ha obtenido una respuesta lineal respecto a la concentración de As en la muestra.

Se han realizado estudios en donde se buscan reporteros novedosos, que sean visibles sin necesidad de un equipo de detección específico o “al ojo desnudo” (Qing Hu, 2010; Yoshida & Inoue, 2008), siendo esta una alternativa adecuada para el uso en campo y

que no requiere personal capacitado. Sin embargo, los resultados en este campo aún son limitados ya que se requieren aditivos en el medio como el IPTG (Ramanathan *et al.*, 1998) que son costosos, o los microorganismos hospederos son de crecimiento lento como *Rhodopseudomonas* sp. (Yoshida *et al.*, 2008).

Adicionalmente, uno de los principales inconvenientes que se presentan a la hora de diseñar y ensamblar un biosensor es la cantidad de expresión basal del reportero en ausencia de As. Es por esto, que Stocker *et al.* (2003) propusieron adicionar una segunda copia del sitio de unión ArsR-ADN ubicada entre el gen *arsR* y el gen reportero. Esta adición resultó en una disminución de la expresión basal del gen reportero y disminuyó el tiempo de respuesta del sensor entre 3 y 5 veces comparado con el sensor sin el sitio de unión adicional.

Una vez diseñado y ensamblado el biosensor, siguen las pruebas en campo. Con este fin, el estudio realizado por Petänen *et al.* (2002) utilizó un biosensor de As construido en *Pseudomonas fluorescens* OS8 (pTPT31) que emite fluorescencia como respuesta para determinar As en muestras de suelo. Este sensor tuvo un rango de detección útil similar a los métodos químicos. Adicionalmente una de las ventajas de este dispositivo es que *P. fluorescens* OS8, al ser una bacteria de suelo, tendría una ventaja en el momento de la adaptación a las medidas *in situ* bajo condiciones naturales.

Por otro lado, se comienza a estudiar la aplicación de los sistemas desarrollados. Es así que ya se encuentra el primer diseño de un *kit* para mediciones en campo conocido como biosensor ARSO_{lux}, este biosensor utiliza como célula hospedadora *E. coli* DH5 α -2697 y el constructo está basado en la utilización del *arsR* junto con su promotor controlando la expresión de los genes *luxCDABE*. Este dispositivo se encuentra en fase de prueba y ha demostrado ser óptimo en campo ya que es posible analizar 160 muestras por día, lo cual es un valor alto comparado con las 60 muestras diarias que se pueden analizar empleando kits comerciales (Siegfried *et al.*, 2012)

Como alternativa al sistema anteriormente mencionado, se han realizado otras aproximaciones como lo son un biosensor en fase sólida que fue diseñado por Siddiki *et al.* (2011) en el cual el complejo trans-cis (*arsR*-reportero) del *GFP*-marcado fue inmovilizado en la superficie de una microplaca. La disociación del complejo es inducida por la unión del As(III). En este sistema las muestras de agua pueden ser directamente

adicionadas, y el arsénico puede ser cuantificado con fluorescencia midiendo el *GFP*-marcado liberado. En el estudio se reportó un límite de detección de 5 µg As(III)/L en aguas purificadas. Este sistema es una alternativa adecuada para la medición *in situ* usando el sistema liofilizado en la fase sólida y es portátil. Sin embargo, unas de sus principales desventajas son el costo de producción y la necesidad de un fluorómetro portátil.

Tabla 1-1. Características de los biosensores de arsénico con sus límites de detección, periodos de inducción y limitantes.

Descripción del biosensor	Límite de detección de As (III) (ug/L)	Periodo de inducción/ tiempo de respuesta (h)	Limitantes/desventajas	Referencia
Biosensores que emplean luciferasa como sistema reportero				
<i>S.aureus</i> RN4220 (pT0021): constructo <i>arsR- lucFF</i>	7,7	2	Baja sensibilidad y bajo coeficiente de inducción. Necesita la adición de sustrato y las medidas son dependientes de O ₂	(Tauriainen <i>et al.</i> , 1997)
<i>E.coli</i> LF20012: constructo <i>arsB- luxAB</i>	10	1	Interferencia con los iones fosfato, no hay rango de detección lineal	(Cai <i>et al.</i> , 1997)
<i>E.coli</i> MC 1067 (pT0031): constructo <i>arsR- lucFF</i>	7,7	1,5	Rápido decaimiento de la luminiscencia en el ensayo in vitro; alta fluorescencia como expresión basal; pH óptimo variable tanto para el crecimiento del constructo como para la producción de luminiscencia	(Tauriainen <i>et al.</i> , 1999)
<i>E.coli</i> DH5α: constructo pJAMA- <i>arsR</i> -ABS- <i>luciferasa</i>	4	1	No se obtuvo respuesta lineal	(Stocker <i>et al.</i> , 2003)
<i>E.coli</i> DH5α (pJAMA):constructo <i>arsR- luxAB</i>	7,5	1	Efecto de los componentes de las aguas subterráneas en la producción de luminiscencia, posibilidad de falsos positivos y negativos.	(Trang <i>et al.</i> , 2005)
<i>S.cerevisiae</i> pdr5Δ: constructo <i>luxAB</i>	0,0007	1	Baja estabilidad genética	(Bakhrat <i>et al.</i> , 2011)

<i>Photobacterium leiognathi</i> luminiscente	4000	0,5	Límite de detección muy alto, se hace necesario un medio complejo, no es específico	(Ranjan <i>et al.</i> , 2012)
<i>E.coli</i> DH5α: constructo pASPW2-arsR-luxCDABE	0,74	2	Alta interferencia con Antimonio, difícil mantenimiento del cultivo bacteriano	(Sharma <i>et al.</i> , 2013)
<i>E.coli</i> constructo <i>arsR:luc</i>	3,75	2	Necesidad de lisis celular para tener señal de fluorescencia	(Hou <i>et al.</i> , 2014)
<i>E.coli</i> JM109 Constructo:arsR-luxA	0,7	0,5	No se obtuvo respuesta lineal	(Ramanathan <i>et al.</i> , 1997)
Biosensores que emplean <i>lacZ</i> como sistema reportero				
<i>E.coli</i> JM109 : <i>arsR-lacZ</i>	7,7	0,5	Es necesario lisar las células para cuantificar el reportero, adición de sustratos costosos	(Ramanathan <i>et al.</i> , 1998)
<i>E.coli</i> JM109 (R773): constructo <i>arsR-lacZ</i>	7,7	17	Alta expresión basal, baja sensibilidad, baja especificidad	(Scott <i>et al.</i> , 1997)
<i>E.coli</i> DH5α (pMV-arsR-ABS): constructo <i>arsR</i> con un segundo sitio para <i>arsR-lacZ</i>	8	1	Largo periodo de crecimiento, análisis semi-cuantitativo	(Stocker <i>et al.</i> , 2003)
Esporas de <i>B.subtilis</i> (ars23) constructo: <i>arsR-lacZ</i>	12	12	Bajo límite de detección, tiempo de germinación de esporas prolongado	(Date <i>et al.</i> , 2007)
<i>E.coli</i> JM109 constructo: <i>arsR-ureasa</i> y <i>arsR-lacZ</i>	5	5	Análisis semi-cuantitativo, interferencia con microorganismos degradadores de urea	(Aleksic <i>et al.</i> , 2007)
<i>E.coli</i> DH5α cepa 2245 constructo: <i>arsR-lacZ</i>	0,2	22	Posibles interferencias con los iones bicarbonato, largo tiempo de incubación	(Wackwitz <i>et al.</i> , 2008)
<i>E.coli</i> 1971, 1981 y 1982 constructo: <i>arsR-ccp</i>	4	4	Posibles interferencias con los iones bicarbonato	(Wackwitz <i>et al.</i> , 2008)

<i>E.coli</i> BBa_J33203 constructo: <i>arsR-lacZ</i>	5	2	Interferencia por los iones bicarbonato, la respuesta es prolongada en células que han sido congeladas	(Joshi <i>et al.</i> , 2009)
Esporas de <i>B.subtilis</i> (ars23) constructo: <i>arsR-lacZ</i>	7,7	2,5	Se requiere optimizar medio para esporas	(Date, Pasini, Sangal, <i>et al.</i> , 2010)
Esporas de <i>B.subtilis</i> (ars23) capturadas en una plataforma microfluidica constructo: <i>arsR-lacZ</i>	7,7	3	Inadecuado para medición in situ	(Date, Pasini, & Daunert, 2010)
<i>E.coli</i> DH5α plásmido pMV <i>arsR:ABS</i>	10	2	Efecto del fosfato y otros residuos industriales sobre la señal	(Ivanina <i>et al.</i> , 2009)
<i>E.coli</i> JN109-pSB1A2-BBa_J15501 constructo: <i>arsR-lacZ</i> y gen xileno	50	24	Largo periodo de respuesta, interferencia por iones bicarbonato, alta posibilidad de falsos positivos	(de Mora <i>et al.</i> , 2011)
<i>E.coli</i> constructo: <i>arsD-lacZ</i>	100	0,5	Bajo limite de detección, no se menciona la interferencia por parte de otros metales	(Chiou <i>et al.</i> , 2011)
<i>E.coli</i> DH5α constructo: <i>arsR-ABS-RBS-lacZ</i>	0,8	4,23	Riesgo de contaminación del electrodo y perturbación con el uso repetido	(Cortés-Salazar <i>et al.</i> , 2013)
Biosensores que emplean <i>green fluorescent protein</i> (gfp) como sistema reportero				
<i>E.coli</i> pIRC140 constructo: <i>arsR-gfp</i>	1	12	Largo periodo de inducción, no se obtuvo respuesta lineal, alta expresión basal	(Roberto <i>et al.</i> , 2002)
<i>E.coli</i> DH5α constructo: <i>arsR-gfp</i>	7,7	1	Baja sensibilidad comparada con el sensor de luciferasa	(Stocker <i>et al.</i> , 2003)
<i>E.coli</i> DH5α (pVLASI) constructo: <i>arsR-gfp</i>	30	2	Altas concentraciones de sales, fosfatos, silicatos y condiciones de pH disminuyen la fluorescencia, alta expresión basal, interferencia de otros metales con la expresión del <i>gfp</i>	(Liao <i>et al.</i> , 2005)
<i>E.coli</i> constructo: 3 copias	7,5	5	Alta expresión basal.	(Tani <i>et al.</i> , 2009)

<i>arsR- gfp</i>				
<i>E.coli</i> DH5α constructo: <i>arsR-pUC18- yfp</i>	615	2	Bajo limite de detección, requiere instrumentos y quipos sensibles	(Hu <i>et al.</i> , 2010)
<i>ArsRCis-gfp</i> trans	5	0,66	Protocolo tedioso, la presencia de iones de Ca interfiere con la señal fluorescente	(Kawakami <i>et al.</i> , 2010)
<i>E.coli</i> constructo: <i>arsR-egfp</i>	10	3,33	Tiempos prolongados de almacenamiento causan decrecimiento en la señal fluorescente. No permite ser almacenado por largos periodos de tiempo	(Buffi <i>et al.</i> , 2011)
<i>ArsRCis-gfp</i> trans, fase sólida	5	0,5	No especifico, resultados variables en condiciones de agua dura	(Siddiki <i>et al.</i> , 2011)
Biosensores que emplean otros sistemas reporteros				
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> 711 constructo: <i>arsR</i> con dos sitios de unión <i>-crtl</i>	rango entre 10 y 50	24	Se requiere una adecuada concentración de sales en el medio, el cambio de color es dependiente del oxigeno disuelto en el medio. Largo periodo de inducción. Necesario cultivo anaeróbico. Interferencia con iones de hierro. Baja sensibilidad a iones arsenato	(Yoshida <i>et al.</i> , 2008)

Nota: Adaptada y modificada de (H. Kaur *et al.*, 2015)

Durante las últimas dos décadas la construcción de biosensores para la detección de As a aumentado de manera exponencial, se han sido diseñado numerosos dispositivos Tabla 1-1 utilizando los diseños de biosensores *Whole-cell* y *Cell-free*. Sin embargo, como se discutió previamente, su aplicación ha tenido inconvenientes como lo son los límites de detección, tiempos de detección, especificidad, costos de producción elevados y la necesidad de equipos costosos para la operación en campo. La mayoría de estos biosensores aun se encuentran en fase de investigación y hasta el momento no se observan iniciativas de uso comercial (Chen *et al.*, 2014). Por lo tanto, las posibilidades para la mejora y desarrollo de estos dispositivos aún son necesarias y se requiere de diseños eficientes, económicos y fáciles de implementar en campo, que estén encaminados a una real aplicación con el fin de solucionar un problema de salud pública.

1.3.3 Genes reporteros

Un gen reportero es definido como una secuencia de nucleótidos que, cuando es introducida en un sistema biológico, produce un fenotipo fácilmente medible y cuantificable una vez ocurre la expresión del gen. Esto permite relacionar la expresión genética con la respuesta emitida (Wood, 1995). Debido a la facilidad de manipulación y ensamblaje de estos genes, se han desarrollado diferentes tipos de biosensores los cuales utilizan los reporteros como marcadores o respuesta de diferentes variables como lo son por ejemplo el crecimiento celular o la medición de toxinas como el naftaleno, biocidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales y solventes entre otros (D'Souza, 2001; Fabricant *et al.*, 1995; Ghim *et al.*, 2010; Heitzer *et al.*, 1992; Miraglia *et al.*, 2011; Preston *et al.*, 2000; Sayler *et al.*, 1999; Van Dyk *et al.*, 1994).

En las últimas décadas se han encontrado diferentes tipos de genes reporteros. Cada uno emite un tipo de señal diferente, razón por la cual las ventajas y desventajas dependen del tipo de gen seleccionado. En la Tabla 1-2 se pueden observar algunos de los genes reporteros comunmente utilizados con sus respectivas ventajas y desventajas. A continuación se describen algunos usos específicos en biosensores descritos para estos genes reporteros.

Tabla 1-2. Genes reporteros comúnmente utilizados para el diseño de biosensores.

Gen	(Proteína)	Ventajas	Desventajas	Referencia
<i>luc</i>	Luciferasa de luciérnaga	Alta sensibilidad, simple, amplio rango dinámico	Requiere de sustratos: ATP, O ₂ y Mg ⁺²	(Lewis <i>et al.</i> , 1998; Naylor, 1999)
<i>lux</i>	Luciferasa bacteriana	Respuesta rápida, fácil manejo	Termolábil (>30°C), requiere O ₂	(Naylor, 1999)
<i>lacZ</i>	β-galactosidasa	Varios métodos de detección, detección a simple vista (“al ojo desnudo”)	Requiere sustratos cromógenos o ensayos colorimétricos complicados	(Daunert <i>et al.</i> , 2000; Yagi, 2007)
<i>gfp</i>	Proteína fluorescente verde	Autofluorescencia, no se requiere sustratos, alta estabilidad	Expresión retardada después de la síntesis de la proteína, alta señal de fondo	(Naylor, 1999; Tsien, 1998)
<i>crtA</i>	<i>Spheroidenone</i>	Detección a simple vista (“al ojo desnudo”), desarrollo de nuevo hospedero diferente de <i>E. coli</i>	Baja sensibilidad, requiere sustratos	(Fujimoto <i>et al.</i> , 2006; Yoshida <i>et al.</i> , 2008)

β -Galactosidasa (Lac Z)

El primer reporte del gen *lacZ* como reportero fue en 1980 por Casadaban *et al.* (1980). La proteína codificada por este gen es la β -galactosidasa, la cual es responsable por la hidrólisis de la lactosa a galactosa y glucosa. Esta enzima es altamente inespecífica y puede hidrolizar sustratos diferentes a la lactosa como por ejemplo los cromógenos o-nitrofenol, X-gal y S-gal, los cuales producen precipitados de color amarillo, azul y negro, respectivamente (Ford *et al.*, 1996). Este gen reportero ha sido candidato para su uso en biosensores debido a que permite una detección reproducible y cuantitativa por diferentes vías: 1) Transducción de señales basadas en la actividad β -gal: este mecanismo se lleva a cabo a través de la polarización electroquímica del p-aminofenol (PAP) producido por la acción enzimática a partir del p-aminofenil β -D galactopiranosido (PAPG); y 2) por medio de la reacción enzimática con el X-gal, produciendo una respuesta colorimétrica (Kaur *et al.*, 2015).

Un ejemplo de su uso en biosensores para la detección de As, es el estudio realizado por Scott *et al.* (1997) donde se reporta un constructo (*arsR+lacZ*) utilizando *E. coli* JM109 como célula hospedadora. En este dispositivo se requiere de la lisis celular para cuantificar la respuesta emitida y se optimizó para realizar lecturas electroquímicas de la señal. Sin embargo, el sistema tiene problemas con la sensibilidad ya que se genera una alta expresión basal lo cual genera errores de lectura. Adicionalmente, el biosensor responde a otros iones como los de bismuto, nitrato, sulfato, fosfato y carbonato.

Luciferasas

Las luciferasas son proteínas que generan luminiscencia y son categorizadas generalmente como eucariotas o procariotas dependiendo de su origen. La luciferasa de luciérnaga – LUC, clonada en 1985 (de Wet *et al.*, 1985) es uno de los reporteros comúnmente usados (de Wet *et al.*, 1987) ya que está categorizado como el sistema de expresión y regulación genética más sensible y simple. Sin embargo, este sistema requiere de la adición de un sustrato costoso para el monitoreo y medición de la actividad reportera, p.e. luciferina.

Este reportero se ha utilizado en biosensores para la detección de As debido a que es el reportero más sensible de los ensayados (Kaur *et al.*, 2015). En el estudio realizado por

Tauriainen *et al.* (1997) se utilizó el gen de luciferasa de *Photinus pyralis* (*lucFF*) que es expresado bajo el control del operon *ars* de *S. aureus*- plásmido P1258 y se utilizaron tres células hospedadoras diferentes (*S. aureus* RN4220, *B. subtilis* BR151 y *E. coli* MC1061). Al finalizar el estudio se encontró que el constructo realizado en *S. aureus* fue el más sensible de los tres demostrando límites de detección de 7,5 µg/L, 4,03 µg/L y 37 µg/L de arsenito, antimonio (III) y cadmio, respectivamente.

Proteínas fluorescentes y cromoproteínas

Green fluorescent protein

Tal vez la proteína más conocida dentro de este grupo es la GFP. Esta fue aislada originalmente de la medusa *Aequoria victoria* (Morin *et al.*, 1971). Sin embargo, este gen no fue clonado sino dos décadas después, en un estudio que mostró que el gen GFP es funcional tanto en sistemas procariotas (ej.: *Escherichia coli*) como en sistemas eucariotas (ej.: *Caenorhabditis elegans*) (Amsterdam *et al.*, 1996). Una de las principales ventajas de este gen reportero es que no necesita adición de sustratos. Por otro lado, hay cerca de 10 diferentes colores de respuesta incluyendo el amarillo, azul y rojo (Gurskaya *et al.*, 2001; Miyawaki *et al.*, 2012; Shaner *et al.*, 2004).

Contrario a lo que ocurre con las luciferasas, las cuales no son funcionales sin un huésped viable, las proteínas fluorescentes son generalmente estables y continúan emitiendo fluorescencia tiempo después de que el huésped muere. Adicionalmente, el fluoróforo generado por la GFP salvaje necesita ser producido por un proceso natural que puede tomar hasta dos horas, sin embargo, se han diseñado mutantes que emiten respuesta después de 5 minutos (Heim *et al.*, 1995).

Su uso en biosensores para la detección de As se ha propuesto debido a la ventaja de que no requiere sustratos como los sistemas diseñados con genes *lux* y *lacZ*. Roberto *et al.* (2002) reportaron la construcción de un biosensor construido en *E. coli* (p1 RC1140) que tenía el gen *arsR* junto con su promotor regulando la expresión del gen *gfp* de *Aequorea victoria*. Este sensor tuvo una respuesta estable después de un periodo de 12 horas de inducción con un límite de detección de 1 µg/L. Sin embargo, no se obtuvo una respuesta lineal en concentración entre 1 µg/L y 10 µg/L.

Cromoproteínas

Las proteínas tipo GFP pueden ser divididas en dos grupos: las 1) proteínas fluorescentes (sección anterior) y las 2) no-fluorescentes o debilmente fluorescentes, conocidas también como cromoproteínas.

Como regla general las cromoproteínas requieren de un grupo prostético: una molécula pequeña no peptídica o un ion metálico que se une a la proteína y es esencial para las propiedades cromógenas de la misma (Lukyanov *et al.*, 2000). Sin embargo, en comparación con otros pigmentos naturales, las cromoproteínas tipo-GFP son inusuales ya que ellas pueden formar cromoforos internos sin la necesidad de co-factores adicionales, catálisis enzimáticas externas u otros sustratos aparte del oxígeno molecular (Heim *et al.*, 1994). Estas ventajas incluyen la habilidad de formar cromoforos en organismos vivos, tejidos o células (Verkhusha & Lukyanov, 2004). Tal vez una de las características más importantes de este tipo de cromoproteínas sea su variedad de colores, que pueden ser clasificados en 4 grupos principales: GFPs, FPs amarillas (YFPs), FPs rojas (RFPs) y las no-fluorescentes que tienen tonalidades desde el naranja al azul (Verkhusha & Lukyanov, 2004).

Los diferentes colores de estas proteínas se originan a partir una unidad fluorescente que se genera en el interior de la cadena polipeptídica (Figura 1-7) (Wachter, 2006). El cromóforo se deriva de una única modificación post-transcripcional autocatalítica de tres aminoácidos consecutivos (XYG) en la secuencia primaria, iniciado por un cerramiento dentro de la cadena formando un anillo, que permite la formación de un grupo ciclopentil (heterociclo de 5 miembros) a partir de los átomos del polipeptido original. La composición aminoacídica del residuo de tres miembros es la que determina el color y propiedades de la cromoproteína y, a pesar que el primero de estos tres aminoácidos puede cambiar (Gln, His, Lys, etc), el segundo y tercer aminoácido son constantes (Remington, 2006; Wilmann *et al.*, 2005). La maduración completa del cromoforo requiere de procesos adicionales que ocurren espontáneamente (Miyawaki *et al.*, 2012; Wachter, 2006).

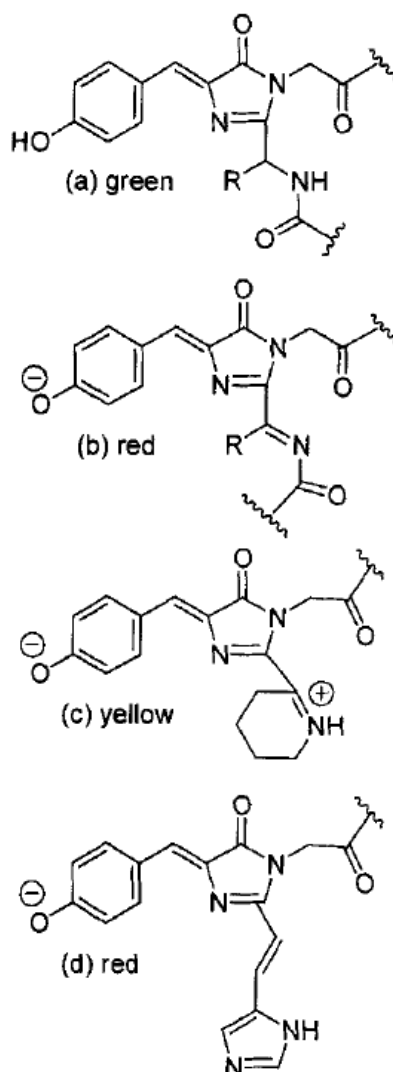


Figura 1-7. Estructuras químicas de los cromóforos de las proteínas tipo-GFP: a) GFP, b) DsRef, c) amarilla *Zoanthus*, d) tipo Kaede. Tomado de (Wachter, 2006).

Algunas proteínas tipo-GFP han sido modificadas genéticamente para su uso en biosensores principalmente en el campo de la biomedicina y con el fin de monitorear los cambios en el ambiente intracelular. Por ejemplo, se ha utilizado estas proteínas con modificaciones genéticas con el fin de utilizarlas como sensores del pH intracelular (Scharnagl *et al.*, 1999) o para determinar el potencial redox mitocondrial (Hanson *et al.*, 2004).

iGEM (Por sus siglas en ingles, *International Genetically Engineered Machine competition*) es una fundación dedicada a la educación, competición y desarrollo de la biología sintética. Su programa líder es la competición en biología sintética que se lleva a cabo anualmente desde el 2004 (https://www.igem.org/Main_Page). El equipo competidor de la Universidad de Uppsala creó una colección de cromoproteínas como parte de su proyecto en el 2012 (Figura 1-8) (iGEM, 2012). Estas cromoproteínas son responsables de la coloración en corales y anemonas de mar (Alieva *et al.*, 2008). El pigmento expresado puede ser visto “al ojo desnudo” sin necesidad de un equipo adicional, convirtiéndolas en una herramienta útil y alternativa para su uso en biosensores. Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado ningún estudio que las emplee como genes reporteros, lo cual genera una falta de información acerca de su comportamiento bajo diferentes condiciones como proteínas reporteras.

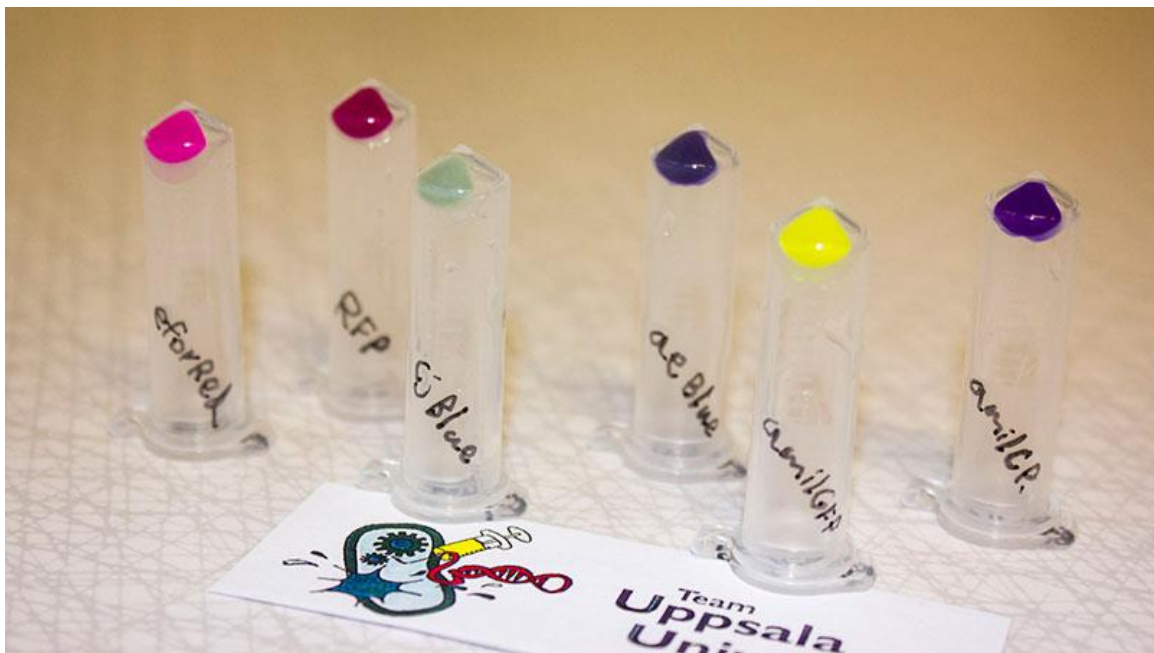


Figura 1-8 . Biomasa celular de *E. coli* expresando algunas de las cromoproteínas de la colección creada por el equipo de la Universidad Uppsala-2012 (iGEM, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar un biosensor para la detección de As en aguas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar y secuenciar regiones que codifican para el regulador *arsR* de bacterias autóctonas de Colombia resistentes a arsénico.
- Ensamblar constructos del gen *arsR* con un gen reportero para el diseño de un biosensor para la detección de arsénico.
- Probar a nivel de laboratorio el biosensor diseñado con distintas concentraciones de As.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos

Los microorganismos cultivables empleados en el proyecto pertenecen al grupo de investigación del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá y se encuentran conservados a -20°C y -80°C en 20 % glicerol.

Al inicio del proyecto de investigación se contó con un grupo de microorganismos provenientes de orígenes diferentes:

- A) Microorganismos resistentes a arsénico recuperados de dos zonas geográficas de Colombia: 1) sabana de Bogotá en la finca La Pradera, en el centro agropecuario de Marengo (Torres, 2008) y 2) Departamento del Cesar en el municipio Agustín Codazzi (Carrillo, 2012). Las 18 cepas utilizadas se seleccionaron según los resultados obtenidos en el estudio "*Identificación de genes involucrados en la transformación y resistencia a arsénico en microorganismos recuperados de zonas de Colombia con la presencia del metal*" (Carrillo, 2012), teniendo como criterios de selección el crecimiento en medio suplementado con arsénico y la presencia del gen *arsB*.
- B) Once clones de *Escherichia coli* EPI300-T1® con ADN metagenómico de muestras provenientes de la sabana de Bogotá y resistentes a arsénico y a cloranfenicol, provenientes del estudio "*Búsqueda de genes de resistencia a arsénico en el metagenoma microbiano de la sabana de Bogotá*" (Latorre, 2014).
- C) Tres cepas control de *E. coli* solicitadas al CGSC (*Coli Genetic Stock Center*, USA). Como control positivo fueron utilizadas las cepas *E. coli* MG1655 y *E. coli* W3110

(Carlin *et al.*, 1995), las cuales tienen resistencia cromosómica a arsenato debido a la presencia del operón *ars*; y como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* AW3110, la cual tiene una mutación en el operón *ars* que le confiere un fenotipo de susceptibilidad a arsénico (Carlin *et al.*, 1995).

3.2 Medios de cultivo

Para el cultivo de los microorganismos obtenidos a partir de muestras de la Sabana y Cesar se utilizó el medio de cultivo TSA (Trypticase Soy Agar) y/o TSB (Trypticase Soy Broth) (Anexo A.1).

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio Luria- Bertani (LB) (Anexo A.2) suplementado con el antibiótico de interés (ver concentraciones de los antibióticos en el Anexo A.3) y diferentes concentraciones de arsénico según fuera necesario: As(III), 0,75 µg/L – 74.920 µg/L; y As(V), 75 µg/L – 750.000 µg/L.

3.3. Amplificación y secuenciación de regiones que codifican para el regulador ArsR de bacterias autóctonas de Colombia resistentes a arsénico

El esquema a continuación Figura 3-1 muestra el procedimiento general utilizado para la amplificación y secuenciación de los genes *arsR* que codifican para el regulador ArsR de las bacterias autóctonas de Colombia. Las siguientes sub-secciones explican los procedimientos detallados realizados para este fin.

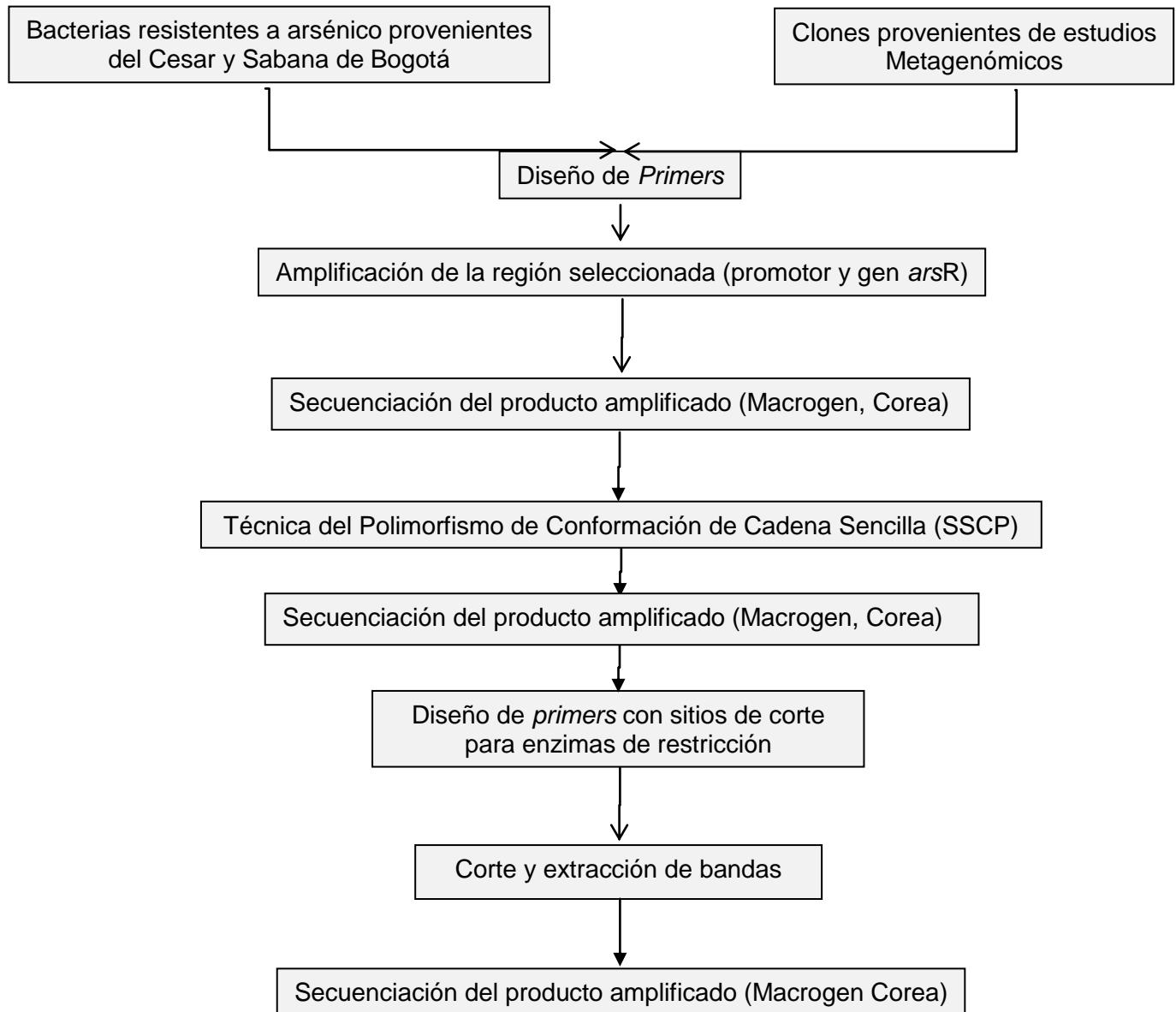


Figura 3-1. Procedimiento general utilizado para la amplificación y secuenciación de los genes *arsR* que codifican para el regulador ArsR de las bacterias autóctonas de Colombia.

3.3.1 Reactivación de bacterias resistentes a arsénico y extracción de ADN

Las bacterias y clones resistentes a arsénico fueron reactivadas a partir de crioviales con 20 % glicerol, almacenados a -20 °C y -80 °C. Las cepas fueron inoculadas en medio TSB e incubadas durante 48 h a 37 °C y 200 rpm. A partir de este cultivo se hicieron pases a medio TSA suplementado con arsenito de sodio (1 mM) y arsenato de sodio (20 mM) para corroborar la resistencia de las cepas al metaloide a evaluar. Posteriormente, se realizaron cultivos en medio TSA y una vez obtenidas colonias, se realizó un pase a medio líquido TSB incubando durante 24 horas a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugó durante 10 minutos a 8500 rpm el cultivo y se realizó la extracción de ADN genómico utilizando el método enzimático propuesto por (Andrews *et al.*, 1996) y descrito en el Anexo B.1.

3.3.2 Diseño de *primers*

Para el diseño de los *primers* para amplificar el gen *arsR* de las cepas provenientes del Cesar y de la Sabana de Bogotá, se realizó una búsqueda bioinformática en los sitios web del NCBI (por sus siglas en inglés: *National Center for Biotechnology Information*) y del EBI (por sus siglas en inglés: *European Bioinformatics Institute*) para obtener secuencias reportadas para el gen *arsR* y su promotor. Se analizaron las secuencias realizando arboles filogenéticos mediante el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013). A partir de la información obtenida se decidió diseñar *primers* específicos para los géneros *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Tabla 3-1). Para esto, se utilizaron las secuencias de cada uno de los géneros y se realizaron alineamientos múltiples utilizando los programas Mega 6 y T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) para determinar las regiones conservadas del gen. Una vez obtenida la secuencia consenso, se utilizó el programa Primer 3plus (Untergasser *et al.*, 2007) para diseñar los *primers* de interés (*Bacillus*esp y *Pseudomonas*esp, Tabla 3-1). Adicionalmente, se tuvieron en cuenta los sitios en donde no había *match* (emparejamiento) para de esta forma diseñar *primers* degenerados (*Bacillus*deg y *Pseudomonas*deg, Tabla 3-1).

Se diseñó un set de *primers* específicos (*E. coli*sp, Tabla 3-1) sobre la secuencia de referencia del genbank de las cepas control resistentes a arsénico *E. coli* W3110 (AP009048.1) y *E. coli* MG1655 (NC_000913.3).

Para el diseño de los *primers* utilizados en los clones obtenidos del estudio metagenómico (Ecolimetag, Tabla 3-1) se partió de las secuencias del gen *arsR* resultantes de dicho estudio (Latorre, 2014) y sobre estas se buscaron regiones fuera del gen (región previa al promotor *arsR* y región inicial del gen *arsB*) para diseñar los *primers* teniendo en cuenta que el objetivo era amplificar tanto el gen *arsR* como su promotor. Adicionalmente se diseñaron *primers* que contenían las secuencias específicas para el reconocimiento de las enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI* junto con una cola poli-GC para mejorar la eficiencia de las posteriores digestiones y que de esta manera las enzimas de restricción puedan cortar correctamente (Metag sitios de corte, Tabla 3-1).

Tabla 3-1. *Primers* diseñados para la amplificación del gen *arsR*.

NOMBRE DEL SET DE PRIMERS	SECUENCIA	TAMAÑO ESPERADO	GEN DIANA
Bacillusesp	F: 5'-TTTGTCTCAGCGAGGACAGACG-3' R: 5'-AGCAGCTACCTTTGCCTGTT-3'	222 pb	<i>arsR</i>
Bacillusdeg	F: 5'-TTTGYCAGCGVGGNCAGAC-3' R: 5'-ARCARCTHCCTTTNCCTGTT-3'	222 pb	<i>arsR</i>
Pseudomonasesp	F: 5'-AACTGTGCGTCTGCGAACT-3' R: 5'-CCGCTTCGAAGAGAGACACT-3'	178 pb	<i>arsR</i>
Pseudomonasdeg	F: 5'-AACTNTGYGTBTGYGARCT-3' R: 5'-AGRCGGTARTASACCCAYT-3'	178 pb	<i>arsR</i>
Ecoliesp	F: 5'-CCGCTTCGAAGAGAGACACT-3' R: 5'-CCTCCCGGATAAAACACATC-3'	447 pb	<i>arsR</i>
Ecolimetag	F: 5'-ACCAACTCAGGGCTGGAAAG-3' R: 5'-ACTCCAGCCGATGCCTAAAC-3'	689 pb	<i>arsR</i> + promotor
Metag sitios de corte*	F: 5'-GCGCGGAATTCACCAACTCAGGGCTGGAAAG-3' R: 5'-GCGCGACTAGTACTCCAGCCGATGCCTAAAC-3'	689 pb	<i>arsR</i> + promotor

*nota: los sitios de corte generados fueron: forward (F), *EcoRI*; reverse (R), *SpeI* (letras en gris); Las letras en negrilla indican las posiciones degeneradas en los *primers* diseñados.

3.3.3 Amplificación y secuenciación del gen *arsR* y promotor

Para la amplificación del gen *arsR* y su promotor se utilizaron los *primers* diseñados previamente (Tabla 3-1) y como ADN molde se utilizó el ADN genómico extraído previamente de las 18 cepas del Cesar y de la Sabana de Bogotá, y de los 11 clones metagenómicos. Los reactivos utilizados para la reacción de PCR (por sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*), sus concentraciones finales están indicados en la

Tabla 3-2 y las condiciones empleadas para la amplificación se encuentran en la Tabla 3-3. Se utilizó un termociclador para la amplificación por PCR (C1000TM Thermal cycler, BioRad). Todas las reacciones fueron evaluadas en electroforesis de gel de agarosa al 1 % en TBE (Anexo A.10) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 100 V durante 60 min, y como marcador de utilizo el HypperladerTM 100 bp IV® (Bioline).

Tabla 3-2. Composición de la reacción de PCR para la amplificación del gen *arsR*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN SOLUCIÓN STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL EN REACCIÓN DE PCR
Buffer enzima Taq	10X	1X
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
dNTP's	10 mM	0,2 mM
Primer Forward	10 µM	0,5 µM
Primer Reverse	10 µM	0,5 µM
Taq polimerasa (Biolase DNA pol. ®Bioline)	5 U/µl	1 U/µl

Nota: reacción realizada en 25 µl de volumen total.

Tabla 3-3. Programas de PCR para la amplificación del gen *arsR* de distintos grupos de microorganismos.

Primers	Denaturación inicial	Denaturación	Annealing	Extensión	Extensión final	No. Ciclos	Tamaño esperado
Bacillus esp.	95°C 5 min	95°C 30s	54°C 30s	72°C 60s	72°C 10 min	30	222 pb
Ecoliesp	95°C 5 min	95°C 30s	54°C 30s	72°C 60s	72°C 10 min	30	447 pb
Bacillus deg.	95°C 5 min	95°C 30s	55°C 30s	72°C 60s	72°C 10 min	30	222 pb
Pseudomonas esp	95°C 5 min	95°C 30s	55°C 30s	72°C 60s	72°C 10 min	30	178 pb
Ecolimetag	95°C 5 min	95°C 30s	60°C 30s	72°C 60s	72°C 10 min	30	689 pb
Metag sitios de corte	95°C 5 min	95°C 30s	75°C 30s	72°C 60s	72°C 10 min	30	689 pb

Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el kit comercial *Ultraclean® PCR clean Up kit* (MO BIO) y se secuenciaron comercialmente (Macrogen-Corea) usando el método de secuenciación de Sanger.

Debido a la baja calidad de los resultados obtenidos en la primera secuenciación de Sanger y a que en algunas ocasiones se vieron dos bandas amplificadas, se decidió emplear la técnica del SSCP (del inglés, *Single-Strand Conformational Polymorphism*) (Anexo B.5) con el fin de observar la conformación que tomaba cada una de las hebras del producto amplificado. Una vez implementada esta técnica con los productos de PCR obtenidos previamente, se realizó un corte de bandas siguiendo el protocolo propuesto por (Dohrmann *et al.*, 2004) (Anexo B.6).

Sobre el ADN recuperado se realizó nuevamente una PCR con los primers denominados Ecolimetag y el producto de esta amplificación fue evaluado siguiendo el procedimiento de electroforesis y secuenciación mencionado anteriormente para las cepas resistentes a arsénico.

Una vez confirmada la secuencia tanto del gen *arsR* como de su promotor, se procedió a amplificar nuevamente esta secuencia utilizando los primers diseñados con los sitios para el reconocimiento de las enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI* (Tabla 3-1) utilizando como ADN molde el ADN genómico del clon M19. El producto de amplificación fue verificado en electroforesis de gel de agarosa al 1 % en TBE (Anexo A.10) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min y como marcador de utilizo el Hypperlader™ 100 bp IV® (Bioline).

3.4 Ensamblaje de los constructos del gen *arsR* con el gen reportero

La Figura 3-2 muestra un esquema con el procedimiento general utilizado para el ensamblaje del gen *arsR* y el gen reportero para el diseño del biosensor para la detección de arsénico. Las siguientes sub-secciones explican los procedimientos detallados realizados para este fin.

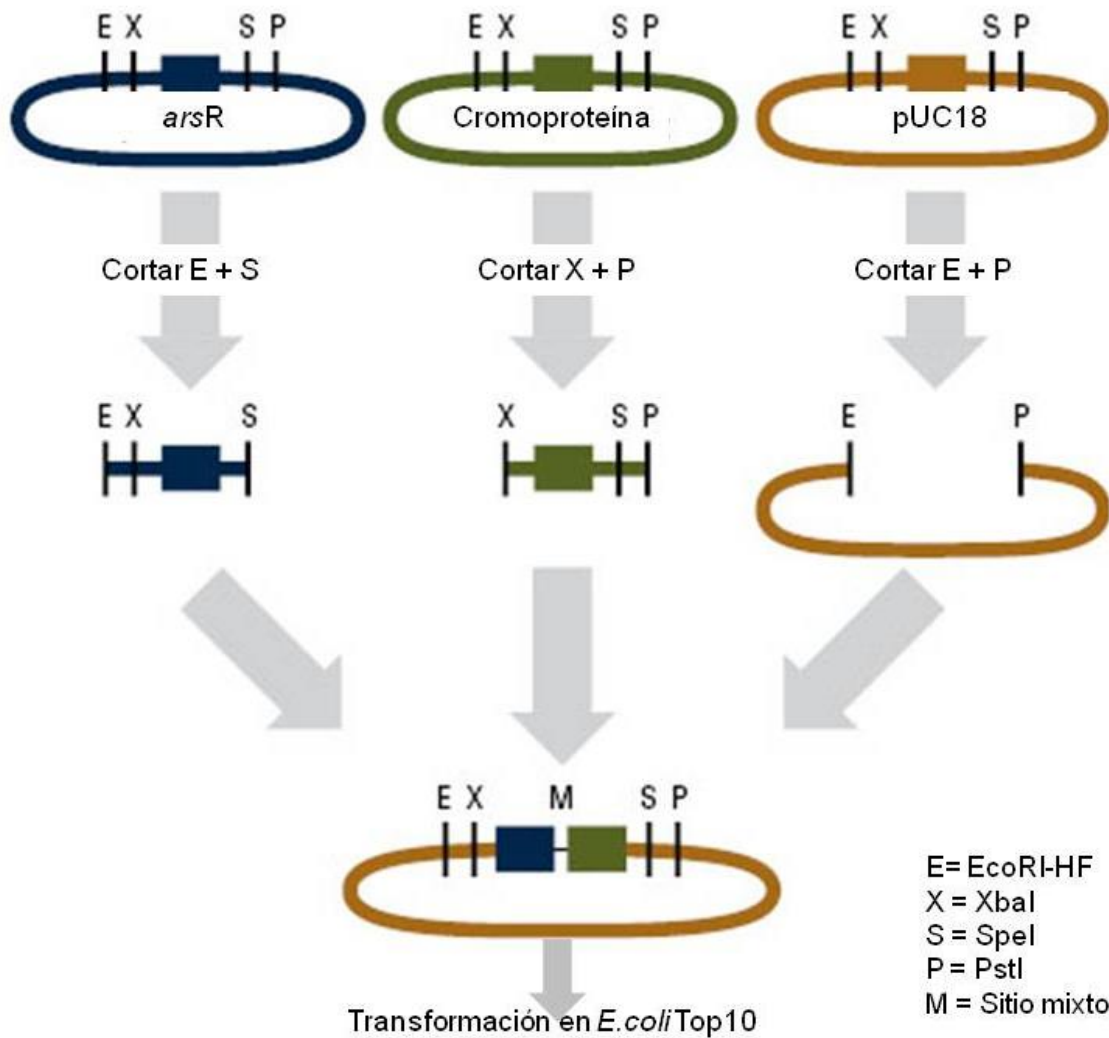


Figura 3-2. Metodología general para el ensamblaje del biosensor. Adaptado del protocolo del Biobrick assembly kit® (New England Biolabs inc).

3.4.1 Selección del gen *arsR* para ensamblaje del biosensor

Debido a que en las amplificaciones por PCR se observaban dos bandas, una alrededor de los 700 pb y la otra alrededor de los 900 pb, y a que al realizar la secuenciación de los productos de PCR el resultado siempre era el gen *arsR* y su promotor (identidad del 100 %, E=0,0 del gen *arsR* de *Escherichia coli* ST540), se decidió amplificar nuevamente las regiones con los primers denominados “Metag sitios de corte” (Tabla 3-1), utilizando el

programa de PCR descrito en la Tabla 3-3, utilizando la cepa M19 proveniente del estudio Metagenómico (Latorre, 2014).

Una vez obtenida la amplificación de la región deseada esta fue comprobada realizando una electroforesis en gel de agarosa *Lowmelting* al 1 % en TAE (A.11) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min. Posteriormente, se realizó un corte y purificación de bandas de los amplicones obtenidos (689 y 920 pb) utilizando el kit comercial *Ultraclean® Gel Spin® ADN extraction kit* (MO BIO).

A partir de estas muestras de ADN y utilizando el plásmido pSB1T3-BBa_J044450 con resistencia a tetraciclina (Anexo C.4), se realizaron digestiones enzimáticas de cada una de las partes (genes *arsR* y plásmido) empleando las enzimas *EcoRI*-HF y *SpeI* del kit de ensamblaje Biobrick assembly kit® (New England Biolabs inc.) y siguiendo el protocolo mencionado en el Anexo B.7.

Con los productos de digestión se realizaron dos ligaciones siguiendo el protocolo del Anexo B.8, manteniendo una relación 2:1 (inserto: plásmido) de 1) gen *arsR* 689 pb + plásmido pSB1T3-BBa_J044450 con resistencia a tetraciclina y de 2) gen *arsR* 920 pb + plásmido pSB1T3-BBa_J044450 con resistencia a tetraciclina. Posteriormente, con los productos de ligación se realizó la transformación por choque térmico (Anexo B.4) en células termocompetentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen).

Una vez obtenidas colonias, se seleccionaron 14 recombinantes positivos (colonias blancas). Se realizó un pase de cada una de las colonias a medio LB líquido suplementado con tetraciclina (15 µg/ml) y se incubó por 24 h a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugó el cultivo a 8500 rpm durante 10 minutos y se realizó la extracción de ADN plasmídico utilizando el kit de extracción *Ultraclean® Gel Spin® 6 minute Mini plasmid prep kit* (MO BIO). A partir de este ADN se realizaron digestiones enzimáticas empleando las enzimas *EcoRI*-HF y *SpeI* del kit de ensamblaje Biobrick assembly kit® (New England Biolabs inc), siguiendo el protocolo mencionado en el Anexo B.7. El producto de digestión fue verificado en electroforesis de gel de agarosa al 1 % en TBE (Anexo A.10) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron 4 recombinantes (2 de cada tamaño) y se secuenciaron comercialmente (Macrogen-Corea) usando el método de secuenciación de Sanger y los primers BBa_G00100 (TGCCACCTGACGTCTAAGAA) y bbA_G00101 (ATTACCGCCTTTGAGTGAGC), los cuales fueron propuestos por (Huang *et al.*, 2010) y permiten identificar los insertos realizados en los plásmidos (vectores) del sistema biobrick-IGEM. Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron analizados con las herramientas bioinformáticas Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013), Uniprot (Consortium, 2015), Blastn y Blastx (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

Se seleccionaron dos recombinantes que contenían el gen *arsR* para seguir con el ensamblaje del biosensor (Anexo C.6 y C.7): *E. coli* TOP10-arsRTet5 (inserto de 920 pb) y *E. coli* TOP10-arsRTe12 (inserto de 689 pb) los cuales fueron conservados en glicerol 20 % y almacenados a -20 y -80 °C.

3.4.2 Upstream part: preparación del gen *arsR* para ensamblaje

Para la obtención y preparación de la parte *upstream* (“aguas arriba”) del biosensor (gen *arsR*) se utilizaron los recombinantes denominados *E. coli* TOP10-arsRTet5 y *E. coli* TOP10-arsRTet12 (Sección 3.4.1) que contienen en su secuencia el gen *arsR* de 920 pb y 689 pb, respectivamente, con los sitios de corte para las enzimas *EcoRI*-HF y *SpeI*, adicional a un casete de resistencia a tetraciclina.

La cepas fueron reactivadas a partir de un criovial con 20 % glicerol almacenado a -80 °C en medio LB suplementado con tetraciclina (15 µg/ml) (LB+Tetraciclina) y, una vez obtenidas colonias, se realizó un pase a medio liquido LB+Tetraciclina incubando durante 24 h a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugó el cultivo a 8500 rpm durante 10 min y se realizó la extracción de plásmido utilizando el método de lisis alcalina descrito en el Anexo B.2.

La digestión enzimática de los plásmidos y partes (genes) empleadas fue realizada utilizando las enzimas del kit de ensamblaje Biobrick assembly kit® (New England Biolabs inc.). Para la digestión enzimática del gen *arsR* y su promotor se emplearon las enzimas *EcoRI*-HF y *SpeI* siguiendo el protocolo mencionado en el Anexo B.7. Se comprobó la digestión realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (Anexo A.10) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min.

3.4.3 *Downstream part*: selección y preparación de cromoproteínas como gen reportero para ensamblaje

Para la selección del gen reportero a usar en el biosensor se tuvo acceso a tres cromoproteínas [pSB1C3-B0034-amilCP (Morada); pSB1C3-B0034-amilGFP (Amarilla); pSB1C3-B0034-asPink (Rosada) obtenidas a partir de corales y anemonas (*Acropora millepora* y *Anemonia sulcata*) por el equipo competidor ante IGEM de la Universidad de Uppsala (iGEM, 2012). Estas cromoproteínas se caracterizan por tener una secuencia de un tamaño aproximado a 700 pb, tener sitios específicos para el reconocimiento de las enzimas *EcoRI*-HF, *SpeI*, *XbaI* y *PstI* fuera de la región codificante (ver mapas plásmidos y secuencias de cada cromoproteína en los Anexos C.1, C.2 y C.3) y expresar color que puede ser detectado a simple vista en un periodo inferior a 24 horas.

Antes de realizar el ensamblaje del biosensor, se decidió realizar la construcción de recombinantes que contenían únicamente las cromoproteínas con el fin de observar la expresión e intensidad del color en una expresión basal. Para esto se realizó la digestión enzimática de las cromoproteínas y el plásmido pUC18 empleando las enzimas *XbaI* y *PstI* siguiendo el protocolo mencionado en el Anexo B.7. Se comprobó la digestión realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE (Anexo A.10) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min.

Con los productos de digestión se realizaron las ligaciones de cada una de las cromoproteínas con el vector pUC18 siguiendo el protocolo descrito en el Anexo B.8, manteniendo una relación 2:1 (inserto – plásmido). Posteriormente con los productos de ligación se realizó la transformación por choque térmico (Anexo B.4) en células termocompetentes de *E. coli* TOP10. Una vez finalizado el tiempo de incubación y observado el color o fluorescencia de las colonias (según la cromoproteína utilizada), se seleccionó una colonia de cada color, se realizó un pase a medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) (LB+Ampicilina), incubando por 24 h a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugó el cultivo a 8500 rpm durante 10 min y se realizó la extracción de plásmido utilizando el método de lisis alcalina descrito en el Anexo B.2 con el fin de verificar el tamaño del plásmido y del inserto. Finalmente, se realizó un cultivo líquido de los tres recombinantes seleccionados (Amarillo, Morado y Rosado) y se conservaron en medio LB+Ampicilina con 20 % glicerol a -20 y -80 °C.

Para preparar la parte *downstream* (“aguas abajo”) o gen reportero de los sensores a construir, se realizó la digestión enzimática de cada una de las cromoproteínas empleando las enzimas *XbaI* y *PstI* siguiendo el protocolo mencionado en el Anexo B.7. Se comprobó la digestión realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE (Anexo A.10) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min.

3.4.4 Vector de clonación.

Para la preparación del vector de clonación pUC18 se reactivó la cepa que contenía el plásmido a partir de un criovial con 20 % glicerol almacenado a -80 °C en medio LB+Ampicilina y una vez obtenidas colonias, se realizó un pase a medio líquido LB+Ampicilina incubando por 24 h a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugó el cultivo a 8500 rpm durante 10 min y se realizó la extracción de plásmido utilizando el método de lisis alcalina descrito en el Anexo B.2.

La digestión enzimática del plásmido fue realizada utilizando las enzimas del kit de ensamblaje Biobrick assembly kit® (New England Biolabs inc.). Para la digestión enzimática del pUC18 se emplearon las enzimas *EcoRI*-HF y *PstI* siguiendo el protocolo descrito en el Anexo B.7. Se comprobó la digestión realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (Anexo A.10) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min.

3.4.5 Ensamblaje de biosensores utilizando cromoproteínas como genes reporteros

- A) Selección entre genes de reconocimiento al arsénico y ensamblaje de biosensor de arsénico utilizando cromoproteína morada (pSB1C3-B0034-amilCP) como gen reportero.

Con los productos de digestión mencionados en las secciones 3.4.2, 3.4.3 y 3.4.4 se realizaron dos ligaciones siguiendo el protocolo descrito en el Anexo B.8, manteniendo una relación 3:3:1 (gen *arsR* : gen reportero : pUC18). Las ligaciones realizadas fueron:

- 1) Gen *arsR* 689 pb + cromoproteína morada pSB1C3-B0034-amilCP + pUC18;
- 2) Gen *arsR* 920 pb + cromoproteína morada pSB1C3-B0034-amilCP + pUC18.

Posteriormente, con los productos de ligación, se realizó la transformación por choque térmico (Anexo B.4) en células termocompetentes de *E. coli* TOP10 y se incubaron en medio LB+Ampicilina a 37 °C por 24 h. Pasado este tiempo de incubación, únicamente se obtuvieron colonias grises-moradas en la ligación 2, por lo tanto se seleccionaron 10 recombinantes positivos de esta ligación y se realizó un pase de cada una de las colonias a medio líquido LB+Ampicilina, incubando por 24 h a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente, se centrifugó el cultivo y se realizó la extracción del plásmido utilizando el método de lisis alcalina descrito en el Anexo B.2. A partir de este ADN plasmídico se realizó una digestión enzimática empleando la enzima *EcoRI*-HF del kit de ensamblaje Biobrick assembly kit® (New England Biolabs inc), siguiendo el protocolo descrito en el Anexo B.7. El producto de digestión fue verificado por electroforesis en gel de agarosa *lowmelting* (Agarose SFR™, Amresco®) al 0,8 % en TAE (Anexo A.11) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min.

Debido a que en el gel de electroforesis se observaron varias bandas de productos indeseados de la ligación, se decidió realizar un corte y purificación de las bandas utilizando el kit comercial *Ultraclean® Gel Spin® ADN extraction kit* (MO BIO) de la banda que correspondía al tamaño de 4282 pb y a partir del ADN purificado se realizó la transformación por choque térmico (Anexo B.4) en células termocompetentes de *E. coli* TOP10 y se incubaron en medio LB+Ampicilina a 37 °C por 24 h.

Una vez obtenidas colonias, se seleccionaron 5 recombinantes positivos (colonias grises-moradas), se realizó un pase de cada una de las colonias a medio líquido LB+Ampicilina y se incubó por 24 h a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugó el cultivo a 13500 rpm durante 5 min y se realizó la extracción de ADN plasmídico utilizando el kit de extracción *Ultraclean® Gel Spin® 6 minute Mini plasmid prep kit* (MO BIO). A partir de este ADN plasmídico se realizaron digestiones enzimáticas empleando las enzimas *EcoRI*-HF y *PstI* del kit de ensamblaje Biobrick assembly kit® (New England Biolabs inc), siguiendo el protocolo descrito en el Anexo B.7. El producto de la digestión fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE (Anexo A.10) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min.

- B) Ensamblaje de biosensores de arsénico utilizando cromoproteínas Rosada (pSB1C3-B0034-asPink) y Amarilla (pSB1C3-B0034-amilGFP) como genes reporteros.

Debido a los ensayos obtenidos en el ensayo A, los dos biosensores de arsénico adicionales fueron ensamblados utilizando el gen *arsR* de 920 pb. Con los productos de digestión mencionados en las secciones 3.4.2, 3.4.3 y 3.4.4, se realizaron dos ligaciones siguiendo el protocolo descrito en el Anexo B.8, manteniendo una relación 3:3:1 (gen *arsR* : gen reportero : pUC18). Las ligaciones realizadas fueron:

- 1) Gen *arsR* 920 pb + cromoproteína amarilla pSB1C3-B0034-amilGFP + pUC18;
- 2) Gen *arsR* 920 pb + cromoproteína rosada pSB1C3-B0034-asPink + pUC18

Posteriormente, con los productos de ligación se realizó la transformación por choque térmico (Anexo B.4) en células termocompetentes de *E. coli* TOP10 y se incubaron en medio LB+Ampicilina a 37 °C por 24 h.

Una vez obtenidas las colonias, se seleccionaron 5 recombinantes positivos de cada una de las ligaciones (colonias amarillas/fluorescentes y rosadas, respectivamente para cada ligación). Se realizó un pase de cada una de las colonias a medio líquido LB+Ampicilina y se incubó por 24 h a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugó el cultivo a 8500 rpm por 10 min y se realizó la extracción de ADN plasmídico utilizando el kit de extracción *Ultraclean® Gel Spin® 6 minute Mini plasmid prep kit* (MO BIO). A partir de este ADN plasmídico se realizaron digestiones enzimáticas empleando las enzimas *EcoRI*-HF y *PstI* del kit de ensamblaje Biobrick assembly kit® (New England Biolabs inc), siguiendo el protocolo descrito en el Anexo B.7. El producto de digestión fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE (Anexo A.10) 1X usando SYBR® Safe (Invitrogen) como agente de tinción de ácidos nucleicos, y aplicando un voltaje de 80 V durante 90 min.

Finalmente, el ADN plasmídico de los 3 constructos de los biosensores de arsénico (BAS) de diferentes colores [morado (BASmor), amarillo (BASama) y rosado (BASros)] se secuenció comercialmente (Macrogen-Corea) usando el método de secuenciación de Sanger y los primers universales para verificar el inserto realizado en el vector pUC18: M13F-pUC (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') y m13R-pUC (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). El análisis de las secuencias obtenidas fue realizado con las herramientas para

análisis bioinformático “A plasmid Editor”, Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013), Blastn y Blastx (Stephen F. Altschul *et al.*, 1990; S. F. Altschul *et al.*, 1997).

Una vez confirmado el ensamblaje de los biosensores se realizó un pase de cada uno a medio líquido LB+Ampicilina y se conservaron en 20 % glicerol a -20 y -80 °C.

3.5 Evaluación a nivel de laboratorio de los biosensores ensamblados a distintas concentraciones de As

La Figura 3-3 muestra un esquema con el procedimiento general utilizado para evaluar los biosensores ensamblados para la detección de arsénico. Las siguientes subsecciones explican los procedimientos detallados realizados para este fin.

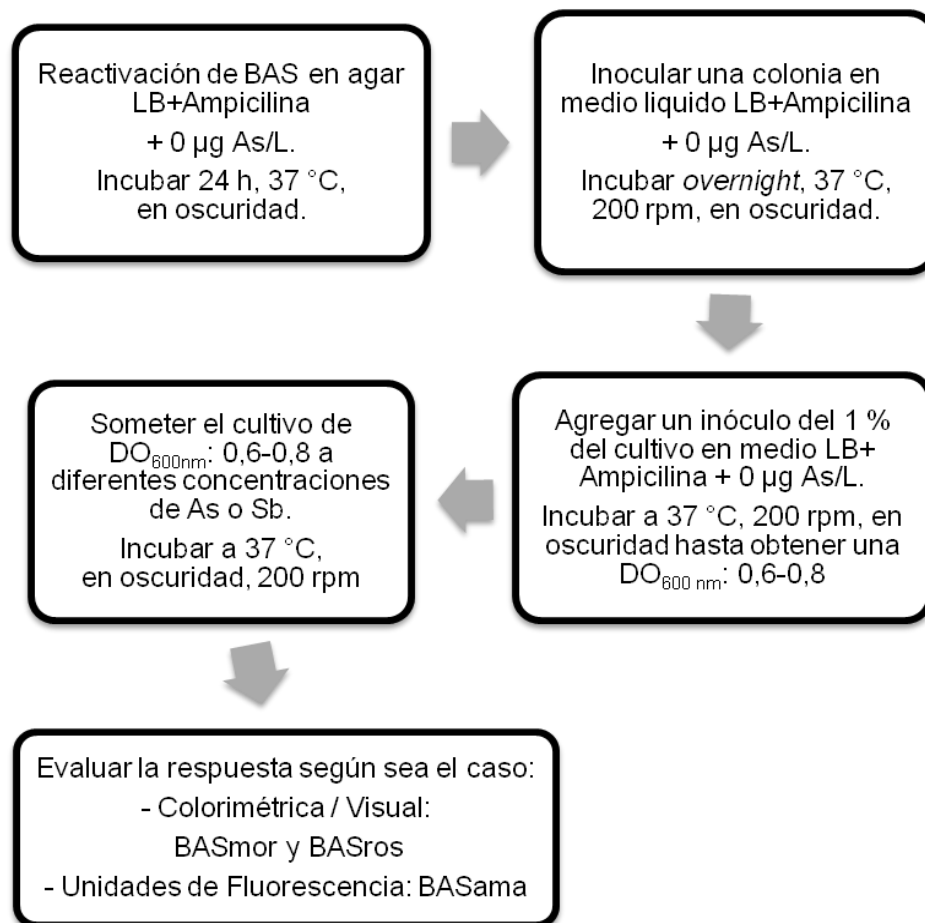


Figura 3-3. Procedimiento general utilizado para evaluar los biosensores ensamblados para la detección de arsénico

3.5.1 Preparación del cultivo.

A partir de los crioviales conservados a -80 °C se reactivó cada uno de los biosensores (BASmor, BASros y BASama) en agar LBA+Ampicilina (medio LB suplementado con 0,2 % glucosa) y se incubó a 37 °C por 24 horas en oscuridad. Se tomó una colonia aislada y se inoculó en medio líquido LBA+Ampicilina dejando el cultivo *overnight* a 37 °C, 200 rpm y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se inoculó el 1 % del cultivo previamente crecido en medio LBA+Ampicilina, se mantuvieron las condiciones de cultivo y se monitoreo el crecimiento celular mediante mediciones de DO_{600nm} hasta que el cultivo se encontró en un valor entre 0,6-0,8. Finalmente, el cultivo fue distribuido en medio LBA (sólido o líquido según el ensayo)+Ampicilina y diferentes concentraciones de arsenito, arsenato ó antimonio [As(III): 0,75 – 74.920 µg/l; As(V): 75 – 75.0000 µg/l; Sb(III): 0,01 – 5000 µg/l].

3.5.2 Selección de condiciones de cultivo para ensayos a diferentes concentraciones de As con los biosensores BASmor y BASros: evaluación cualitativa.

Con el fin de evaluar bajo qué condiciones de cultivo (medio líquido ó sólido, y rango de temperaturas) y en qué tiempo se expresaba mejor el color de los biosensores, se diseñaron dos ensayos cualitativos teniendo como variable respuesta el cambio de color a simple vista en las diferentes concentraciones de arsenito. Los tipos de ensayos evaluados se describen a continuación:

A) Evaluación cualitativa para establecer las condiciones del cultivo: medio sólido vs. medio líquido.

A partir de un criovial del BASmor conservado a -80 °C se realizó el procedimiento descrito en el numeral 3.5.1 de preparación del cultivo el cual fue distribuido en las diferentes condiciones (medio LBA+Ampicilina solido o líquido) y sometido a diferentes concentraciones de arsenito [0, 75, 750 y 75.000 µg As(III)/l], incubando a 37 °C, 200 rpm y bajo luz blanca. El color de las colonias o de la suspensión celular fue evaluado a las 12, 24, 36 y 48 h de forma cualitativa en cada una de las condiciones. A continuación se describen los procedimientos utilizados para el cultivo de los microorganismos y evaluación cualitativa.

Condiciones de cultivo y evaluación:

- Se distribuyeron 7,5 ml de cultivo celular (DO_{600nm} de 0,6) en tubos de vidrio de 13x125 mm con tapa rosca (n=3) por cada una de las concentraciones de arsenito a evaluar y se suplementó el cultivo con arsenito de sodio estéril de acuerdo a la concentración deseada en cada punto. Finalizado el tiempo de incubación se realizó una homogenización de la muestra con vortex y se evaluó si había cambio de color a simple vista.
- Se distribuyó 1 ml de cultivo celular (DO_{600nm} de 0,6) en microtubos de 2 ml (n=3) por cada una de las concentraciones de arsenito a evaluar y se suplementó el cultivo con arsenito de sodio estéril de acuerdo a la concentración deseada en cada punto. Finalizado el tiempo de incubación se centrifugaron los cultivos a 13.000 rpm durante 5 min y se evaluó si había cambio de color perceptible a simple vista en cada uno de los pellets.
- Se realizó un aislamiento a partir del cultivo (DO_{600nm} de 0,6) en agar LBA+Ampicilina suplementado con las diferentes concentraciones de arsenito de sodio teniendo un n=3 en cada concentración. Finalizado el tiempo de incubación se evaluó si había cambio de color a simple vista.
- A partir del cultivo celular (DO_{600nm} 0,6) se realizó una siembra masiva en agar LBA+Ampicilina suplementado con las diferentes concentraciones de arsenito de sodio teniendo un n=3 en cada concentración. Finalizado el tiempo de incubación se evaluó si había cambio de color a simple vista. Posteriormente se recolectó la biomasa presente en la caja de Petri con puntas de micropipeta y se evaluó si había cambio de color en la biomasa.

•
B) Evaluación cualitativa para establecer las condiciones de temperatura y tiempo de incubación.

A partir de un criovial del BASmor conservado a -80 °C se realizó el procedimiento descrito en el numeral 3.5.1 de preparación del cultivo. Del cultivo celular (DO_{600nm} de 0,6) se realizó una siembra masiva en agar LBA+Ampicilina suplementado con diferentes concentraciones de arsenito (0, 75, 750, 75000 μg As(III)/L) teniendo un n=3 en cada concentración. Se incubó a diferentes temperaturas (T ambiente, 30 °C y 37 °C) y luz blanca. El color fue evaluado a las 24 y 48 h de manera cualitativa en cada una de las condiciones.

Finalizado el tiempo de incubación se evaluó si había cambio de color a simple vista. Posteriormente se recolectó la biomasa presente en la caja de Petri con puntas de micropipeta y se evaluó si había cambio de color en la biomasa.

C) Evaluación cualitativa para establecer las condiciones de luz del cultivo.

A partir de un criovial del BASmor conservado a -80 °C se realizó el procedimiento descrito en el numeral 3.5.1 de preparación del cultivo. Del cultivo celular (DO_{600nm} 0,6) se realizó una siembra masiva en agar LBA+Ampicilina suplementado con diferentes concentraciones de arsenito [0, 75, 750 y 75.000 μg As(III)/l], teniendo un $n=3$ en cada concentración. Se incubó a 37 °C y se evaluaron dos condiciones de luminosidad (luz blanca y oscuridad). El color fue evaluado a las 24 y 48 h de manera cualitativa en cada una de las condiciones.

Finalizado el tiempo de incubación se evaluó si había cambio de color a simple vista. Posteriormente se recolectó la biomasa presente en la caja de Petri con puntas de micropipeta y se evaluó si había cambio de color en la biomasa. Adicionalmente, se resuspendió la biomasa recolectada en 1,5 ml de NaCl 0,85 % en un microtubo de 1,5 ml y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se evaluó el cambio de color a simple vista en cada concentración.

3.5.3 Evaluación colorimétrica de los biosensores BASmor y BASros bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio.

A partir de un criovial conservado a -80 °C de cada uno de los biosensores (BASmor y BASros) se realizó el procedimiento descrito en el numeral 3.5.1 de preparación del cultivo. Para este ensayo se establecieron tres tratamientos con dos diferentes estados de oxidación de arsénico (III y V) y del antimonio (III). Del cultivo celular (DO_{600nm} de 0,7) se realizó una siembra masiva en agar LBA+Ampicilina suplementado con diferentes concentraciones del metaloide [As (III): 0, 75, 374, 750, 3746, 7500, 37.460 y 75.000 μg As(III)/l; As(V): 0, 75, 750, 3746, 7500, 37.460, 75.000, 750.000 μg As(V)/l; y Sb(III): 0,1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 μg Sb(III)/l], teniendo un $n=3$ en cada concentración. Se incubó por 24 h a 37 °C y en oscuridad.

Finalizado el tiempo de incubación se recolectó la biomasa de la caja de Petri y se resuspendió en 1,5 ml de medio mínimo M9 (Anexo A.5) en un microtubo de 1,5 ml. El cambio de color fue evaluado en un colorímetro de mesa ColorQuest XE (Hunterlab). Los colores basados en los espectros de luz transmitida a través de los cultivos se representaron en el sistema CIE-L*a*b (McLaren, 1976).

3.5.4 Evaluación de fluorescencia del biosensor BASama bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio

A partir de un criovial conservado a -80 °C del BASama se realizó el procedimiento descrito en el numeral 3.5.1 de preparación del cultivo, sin embargo, para este ensayo, una vez obtenido la DO_{600nm} de 0,6 se conservaron las células en medio LB+glicerol (20%) a -80 °C. Para este ensayo se establecieron tres tratamientos con dos diferentes estados de oxidación de arsénico (III y V) y del antimonio (III). Se evaluaron diferentes concentraciones de cada uno: arsenito y antimonio [As (III): 0, 0,75, 7,5, 37,5, 75, 374, 750, 3746, 7500, 37.460, 75.000 µg As(II)/L; As(V): 0, 75, 750, 3746, 7500, 37.460, 75.000, 750.000 µg As(V)/L; y Sb(III): 0, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 µg Sb(III)/L], teniendo un n=3 en cada concentración. Una vez descongelado el cultivo celular (DO_{600nm} de 0,6), se tomaron alícuotas de 4 ml que fueron distribuidas en tubos falcon de 15 ml estériles y se adicionó la cantidad determinada del metaloide estéril a cada replica. Se incubó por 4 h a 37 °C, 200 rpm y en oscuridad.

Transcurrido este tiempo se centrifugó el cultivo a 8.500 rpm durante 15 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la biomasa en NaCl 0,85 %. Las unidades de fluorescencia fueron medidas en un espectrofluorómetro con lámpara de xenón (PTI QuantaMaster 300), con una longitud de onda de excitación de 265 nm y una longitud de onda de absorción en un rango entre 515–535 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Amplificación y secuenciación de regiones que codifican para el regulador *arsR* de clones metagenómicos y bacterias autóctonas de Colombia resistentes a arsénico

4.1.1 Amplificación y secuenciación de regiones que codifican para el regulador *arsR* del cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada, Universidad Nacional de Colombia

De las 18 cepas del Cesar/Sabana de Bogotá (Carrillo, 2012) y de los 11 clones obtenidos a partir del estudio de metagenómica (Latorre, 2014), se obtuvieron 26 resultados positivos para el gen *arsR* (Tabla 4-1 y Tabla 4-2). Este resultado es acorde a lo esperado ya que los *primers* diseñados tenían como objetivo las regiones conservadas de los genes *arsR* de los géneros *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., los cuales son los principales géneros presentes en el cepario de trabajo.

Al analizar la Tabla 4-1 se puede observar que los *primers* diseñados para el género *Escherichia* sp. amplificó el gen *arsR* en diversos géneros bacterianos como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Sinomonas* sp.. Este fenómeno sugiere un alto grado de conservación evolutiva de los determinantes *ars* de bacterias Gram-negativas (Saltikov *et al.*, 2002) y probablemente, como lo menciona Diorio *et al.* (1995), los determinantes cromosómicos *ars* pudieron ser los predecesores de los operones *ars* en plásmidos. Este planteamiento permite atribuir el resultado obtenido en la Tabla 4-1 a la posible transferencia horizontal de genes, un proceso mediante el cual un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente (Arber, 2014). Este fenómeno, común en procariotas, ha sido observado principalmente en el aumento de la resistencia microbiana a antibióticos y en el aumento de la resistencia a diversos tipos de metales

como en el caso de *Pseudomonas putida* (Cánovas *et al.*, 2003) y de *Escherichia coli* (Saltikov *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1996).

Tabla 4-1. Genes de resistencia al arsénico identificados en las cepas del Cesar y de la Sabana de Bogotá pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada. Los resultados mostrados son una compilación entre los genes *arsB*, *aroA* y *arsC* identificados por (Carrillo, 2012) y los genes *arsR* identificados en el presente trabajo.

Código Cepa	Microorganismo	Gen				
		<i>arsB</i>	<i>aroA</i>	<i>arsC</i>	<i>arsR</i>	Primer(s)
SABANA A (SA)	<i>Bacillus</i> sp.	ND	ND	ND	+	Ecoliesp Ecolimetag
SABANA G (SG)	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	*	-	∅
SABANA H (SH)	<i>Pseudomonas putida</i>	+	-	-	+	Ecoliesp Ecolimetag
SABANA K (SK)	ND	*	-	*	+	Ecoliesp Ecolimetag
SABANA L (SL)	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	*	+	Ecoliesp Ecolimetag
SABANA N (SN)	ND	+	*	*	+	Ecoliesp Ecolimetag
CESAR 1 (C1)	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	+	Ecoliesp Ecolimetag
CESAR 3 (C3)	<i>Bacillus safensis</i>	-	-	-	+	Ecoliesp Ecolimetag
CESAR 4 (C4)	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	+	Bacillusesp
CESAR 7 (C7)	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	+	Ecoliesp Ecolimetag
CESAR 9 (C9)	ND	-	-	-	-	∅
CESAR 10 (C10)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	∅
CESAR 11 (C11)	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	+	Bacillusesp
CESAR 12 (C12)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-	-	+	Ecoliesp Ecolimetag
CESAR 13 (C13)	<i>Microbacterium marinilacus</i>	-	-	-	+	Ecoliesp Ecolimetag
CESAR 14 (C14)	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	-	-	-	+	Ecoliesp Ecolimetag
CESAR 15 (C15)	<i>Microbacterium marinilacus</i>	+	-	-	+	Ecoliesp Ecolimetag
CESAR 16 (C16)	<i>Sinomonas flava</i>	+	-	-	+	Ecoliesp Ecolimetag

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo; (*): Falso positivo: estas cepas originaron inicialmente un resultado positivo para la amplificación, sin embargo, se encontró en posteriores análisis que estos productos eran artefactos de amplificación; ND, no determinado; (∅): En estos ensayos fueron probados todos los primers diseñados (Tabla 3-1) y bajo las condiciones del estudio no se obtuvieron amplificaciones.

Tabla 4-2. Genes de resistencia al arsénico identificados en los clones obtenidos de estudio Metagenómico pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada. Los resultados son una compilación entre los genes *arsB* y *arsC* identificados por (Latorre, 2014) y el gen *arsR* identificado en el presente trabajo con los *primers* “Ecolimetag” (Tabla 3-1).

Código Clon Metagenómico	Gen		
	<i>arsB</i>	<i>arsC</i>	<i>arsR</i>
E21	+	-	+
E22	+	-	+
F6	+	-	+
I13	+	-	+
K4	+	-	+
L16	+	-	+
M14	+	-	+
M15	+	-	+
M18	+	-	+
M19	+	-	+
M22	+	-	+

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo.

En los clones evaluados (Tabla 4-2) se obtuvieron 11 resultados positivos para el gen *arsR* cromosómico de *Escherichia coli*, lo cual permite deducir, con la información obtenida, que el mecanismo de resistencia al arsénico insertado en estos clones es el del operón *arsRBC*. Sin embargo, al analizar los resultados obtenidos en los estudios anteriores (Carrillo, 2012; Latorre, 2014), donde no se observa la amplificación del gen *arsC* (Carrillo, 2012; Latorre, 2014), se puede concluir que los *primers* utilizados en esos estudios para el gen *arsC* no fueron los adecuados una vez que no se observó la amplificación de este gen para la mayoría de los aislados o clones metagenómicos.

Por otro lado, los *primers* denominados *Pseudomonasesp* y *Pseudomonasdeg* (Tabla 3-1) no fueron adecuados para amplificar el gen *arsR* en ninguna de las cepas evaluadas ya que no se obtuvieron resultados de amplificación positivos. Esta situación se puede deber a los siguientes motivos:

1. Al diseñar los *primers*, la divergencia de la región *target* (“diana”) en el ADN era muy alta, situación similar a lo ocurrido en el estudio de Saltikov *et al.* (2002), quien manifestó los mismos inconvenientes al tratar de identificar los genes *arsB*, *arsC* y *arsA* en diversas especies de *Pseudomonas* sp. encontrando porcentajes de similitud muy bajos entre los genes *arsR* y *arsC* estudiados (gen *arsR*: 67 %; gen

arsC: 29 %), razón por la cual en este estudio tampoco pudieron amplificar dichos genes en este género de bacterias.

2. A causa de la situación anterior se hizo necesario el diseño de *primers* degenerados con muchas posiciones variables, lo cual hace que los *primers* sean menos específicos y por lo tanto no permitan eventualmente la amplificación deseada.

Se debe tener en cuenta que el gen *arsR* únicamente tiene en su secuencia un 30 % de similitud entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Carlin *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1991). Esta alta diversidad se puede ver reflejada en la Figura 4-1. donde se muestra que hay varias secuencias de TFBSs (*Transcription Factors Binding Sites*) para los sitios de unión u operadores del gen *arsR* según el *phylum* de las bacterias de interés. Por ejemplo (recuadro en la Figura 4-1.), en el caso de el ArsR-Bacillales (Phylum: Firmicutes) se presentan 5 sitios de unión (*arsR*) con secuencias de ADN distintas, en donde se puede observar algunas regiones conservadas de la secuencia mostrada (Logo, posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 15 y 16). Esta figura fue tomada de la base de datos *RegPrecise* (<http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/>) que está basada en genómica comparativa para la captura, visualización y análisis de los factores de transcripción/regulons (proteínas que reconocen sitios de unión específicos para activar/reprimir la transcripción de genes, como por ejemplo el gen *arsR*).

En el estudio realizado por Diorio *et al.* (1995) se demostró que en bacterias Gram-negativas, el plásmido que contiene el operón *ars* tiene una alta homología en sus secuencias (incluyendo el gen *arsR* del operón cromosómico de *Pseudomonas aeruginosa*), pero es altamente divergente de las bacterias Gram-positivas. Sin embargo, los análisis de secuencias realizados por Cai *et al.* (1998) revelaron que el operón cromosómico *ars* de *Pseudomonas aeruginosa* está relacionado evolutivamente con operones *ars*-plásmidicos tanto de bacterias Gram-positivas como de Gram-negativas y que está conservado en el cromosoma de algunas, pero no todas las especies de *Pseudomonas*. Esto hace que la identificación de los genes *ars* presentes en este género de bacterias sea difícil ya que, por ejemplo, la secuencia aminoacídica del gen *arsR* cromosómico de *P. aeruginosa* únicamente tiene un 28-44 % de similitud con otros operones *ars* (Cai *et al.*, 1998).

Phylum	Regulog	TF regulons (studied genomes)	TFBSs	Logo
Actinobacteria	ArsR - Corynebacteriaceae	5 (8)	22	
Cyanobacteria	ArsR - Cyanobacteria	10 (14)	19	
Firmicutes	ArsR - Bacillales	5 (11)	16	
Firmicutes	ArsR - Staphylococcaceae	6 (7)	26	
Proteobacteria/delta	ArsR - Desulfovibrionales	8 (10)	32	
Proteobacteria/delta	ArsR2 - Desulfovibrionales	4 (10)	5	
Proteobacteria/delta	ArsR3 - Desulfovibrionales	2 (10)	4	
Firmicutes	AseR - Bacillales	8 (11)	13	
Actinobacteria	CadR - Corynebacteriaceae	7 (8)	18	
Chloroflexi	Caur_3587 - Chloroflexi	5 (5)	11	
Actinobacteria	Cg1831 - Corynebacteriaceae	2 (8)	4	
Firmicutes	CzcR1 - Lactobacillaceae	3 (15)	10	
Firmicutes	CzcR2 - Lactobacillaceae	3 (15)	7	
General statistics				
TF regulogs		40		
TF regulons		204		
TF binding sites		465		

Figura 4-1. Colección de “regulogs” de la familia de factores transcripcionales para el gen *arsR*. Regulon: es un set de genes en un genoma particular regulado por el mismo factor de transcripción; TFBS: operador-sitios de unión; Regulog: se utiliza en genómica comparativa, es un grupo de regulons operado por factores de transcripción (TFs) (RegPrecise, 2009-2015).

De los 26 resultados positivos para la amplificación del gen *arsR* (Tabla 4-1 y Tabla 4-2), se identificaron 2 secuencias diferentes del gen:

- La primera fue identificada en dos cepas de *Bacillus* sp (CESAR 4 y CESAR 11) amplificada con los *primers* bacillusesp, con un porcentaje de identidad del 99 % y un valor E de 2E-64 con el gen *arsR* de la cepa *Bacillus cereus* ATCC14579 (Figura 4-2.);
- La segunda fue identificada en las 24 cepas restantes con los *primers* Ecoliesp y Ecolimetag, con un porcentaje de identidad del 100 % con el gen *arsR* de la cepa *Escherichia coli* ST540 (Figura 4-3.).

El primer gen *arsR* identificado se encuentra relacionado filogenéticamente con el gen *arsR* de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Figura 4-2. Figura 4-4.), el cual fue identificado por (Ivanova *et al.*, 2003). Adicionalmente, como se ve en las Figura 4-2 y Figura 4-4, este gen presenta homologías con otras especies del género *Bacillus* sp. como por ejemplo: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus mycoides*; pertenece al operón descrito como *arsRBC* comúnmente presente en bacterias Gram-positivas (RegPrecise, 2009-2015; Silver *et al.*, 1981).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

AT

Alignments

Download

GenBank

Graphics

Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome	254	254	100%	2e-64	99%	AE016877.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056, complete genome	226	226	100%	4e-56	95%	CP004123.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis Bt407, complete genome	226	226	100%	4e-56	95%	CP003889.1

Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome

Sequence ID: [gb|AE016877.1|](#) Length: 5411809 Number of Matches: 1

Range 1: 3123757 to 3123899 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
254 bits(137)	2e-64	141/143(99%)	0/143(0%)	Plus/Plus

Features: [Arsenical resistance operon repressor](#)

Query	1	TCCGCATCATTTAAATCATAATAACTCCACGTACCTTTTGTTCTTTTACAATCAAACCT	60
Sbjct	3123757	TCCGCATCATTTAAATCATAATAACTCCACGTACCTTTTGTTCTTTTACAATCAAACCT	3123816
Query	61	GCACTCTAATAAAATTTTAAATGATATGATAATTTAGATTGCGTCATTTCAAAAACCTTCT	120
Sbjct	3123817	GCACTCTAATAAAATTTTAAATGATATGATAATTTAGATTGCGTCATTTCAAAAACCTTCT	3123876
Query	121	GTGAAATCATTACACGCTCTG	143
Sbjct	3123877	GTGAAATCATTACACGCTCTG	3123899

Figura 4-2. Análisis blastn obtenido con la secuencia consenso de la PCR realizada con los primers Bacillus para las cepas CESAR 4 y CESAR 11.

Download GenBank Graphics Sort by: E value					
Escherichia coli strain ST540, complete genome					
Sequence ID: gb CP007391.1 Length: 4875682 Number of Matches: 2					
Range 1: 327998 to 328777 GenBank Graphics Next Match Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1441 bits(780)	0.0	780/780(100%)	0/780(0%)	Plus/Minus	
Features: arsenical pump membrane protein ArsR family transcriptional regulator					
Query	1	TAAGAACTCTCTCACTCCAGCCAGAGCCACCAACTCAGGGCTGGAAAGTAAAAACCGAC	60		
Sbjct	328777	TAAGAACTCTCTCACTCCAGCCAGAGCCACCAACTCAGGGCTGGAAAGTAAAAACCGAC	328718		
Query	61	GCAAAGTCGGTtttttttACGTCTGATTGAGACCTCCTTTCAAATGAATAGCCAACCTCAA	120		
Sbjct	328717	GCAAAGTCGGTtttttttACGTCTGATTGAGACCTCCTTTCAAATGAATAGCCAACCTCAA	328658		
Query	121	AATTCACACCTATTACCTTCCTCTGCACTTACACATTCGTTAAGTCATATAIGTTTTGA	180		
Sbjct	328657	AATTCACACCTATTACCTTCCTCTGCACTTACACATTCGTTAAGTCATATAIGTTTTGA	328598		
Query	181	CTTATCCGCTTCGAAGAGAGACTACCTGCAACAATCAGGAGCGCAATATGTCATTCT	240		
Sbjct	328597	CTTATCCGCTTCGAAGAGAGACTACCTGCAACAATCAGGAGCGCAATATGTCATTCT	328538		
Query	241	GTTACCCATCCAATTGTTCAAAATTCCTGCTGATGAAACCCGCTGGGCAICGTTTTACT	300		
Sbjct	328537	GTTACCCATCCAATTGTTCAAAATTCCTGCTGATGAAACCCGCTGGGCAICGTTTTACT	328478		
Query	301	GCTCAGCGAACTGGGAGAGTTATGCGTCTGCGATCTCTGCACTGCTCTCGACCACTCGCA	360		
Sbjct	328477	GCTCAGCGAACTGGGAGAGTTATGCGTCTGCGATCTCTGCACTGCTCTCGACCACTCGCA	328418		

Figura 4-3. Análisis blastn obtenido con la secuencia consenso de la PCR realizada con los primers Ecolimetag para las cepas SH, SK, SL,C7, C12,C13,M22 Y E21.



Figura 4-4. Árbol filogenético realizado con la secuencia *arsR* del género *Bacillus* sp obtenida en este estudio. El árbol filogenético fue obtenido con la herramienta *blast tree view* en la que se construye una alineación con los resultados obtenidos a partir del alineamiento realizado en *blastn* con la secuencia *query* y los resultados obtenidos en las bases de datos.

El segundo gen *arsR* identificado en las cepas evaluadas, es altamente similar al reportado para *E. coli* ST540 (Figura 4-3.). El operón de resistencia a arsénico en *E. coli* ha sido altamente estudiado: este puede encontrarse tanto en cromosoma como en plásmido y puede presentarse en la forma *arsRBC* ó *arsRDABC*, respectivamente (Carlin *et al.*, 1995; Silver *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 1996). En ambos casos, los genes se encuentran organizados en una misma unidad transcripcional de manera que se codifica para un represor inducible con arsénico (gen *arsR*) (Wu *et al.*, 1991), una proteína chaperona ArsD que transfiere el As(III) a ArsA (gen *arsD*) (Wu *et al.*, 1993), una ATPasa ArsA/ArsB ubicada en la membrana que se encarga del flujo del arsenito fuera de la célula (gen *arsA* y gen *arsB*) (Silver *et al.*, 1993), y una arsenato reductasa ArsC que reduce los iones de arsenato a arsenito (gen *arsC*) (Ji *et al.*, 1992).

Con el fin de determinar y seleccionar el gen *arsR* que sería utilizado para el diseño y ensamblaje de los biosensores a As, se tuvo en cuenta que en la población de análisis (24 cepas positivas a *arsR*) de este estudio, el 91,6 % de la población resultó positiva

para el gen *arsR* de *E. coli* ST540. Teniendo en cuenta que algunos de los biosensores a arsénico contruidos por otros grupos de investigación lo han utilizado (Cai *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2010; Ramanathan *et al.*, 1998; Stocker *et al.*, 2003), se decidió continuar con este gen *arsR* para el ensamblaje de los constructos deseados con el fin de hacerlo comparable con otros estudios. Así, se continuó trabajando con el material genético insertado en los clones del estudio Metagenómico (Tabla 4-2).

En el estudio realizado por Rosenstein *et al.* (1994) se demuestra que a pesar de que los diversos tipos de gen *arsR* cumplen la misma función, estos no tienen la misma sensibilidad, y teniendo en cuenta que los dos genes *arsR* identificados en este trabajo no tienen el 100% de similitud en su secuencia génica, se plantea como una alternativa interesante estudiar a futuro la sensibilidad a arsenito del gen *arsR* obtenido en el género *Bacillus* sp.

4.1.2 Identificación gen *arsR* de *Escherichia coli* en clones metagenómicos

En las amplificaciones del gen *arsR* de los clones metagenómicos con los *primers* (Ecolimetag) diseñados para amplificar tanto el gen *arsR* como su promotor se observó una doble banda (Figura 4-5.). Por esta razón, se empleó un análisis de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) con los fragmentos amplificados para poder observar si la PCR estaba siendo inespecífica y si se estaba amplificando una región diferente a la deseada. Una vez que el análisis por SSCP está basado en el distinto comportamiento electroforético que presentan las moléculas monocatenarias de ADN según su secuencia en un gel de poliacrilamida no desnaturizante, el plegamiento de los fragmentos de ADN monocatenario será determinado por la secuencia específica de cada molécula lo que permite diferenciar moléculas de ADN distintas pero del mismo tamaño (Dohrmann *et al.*, 2004).

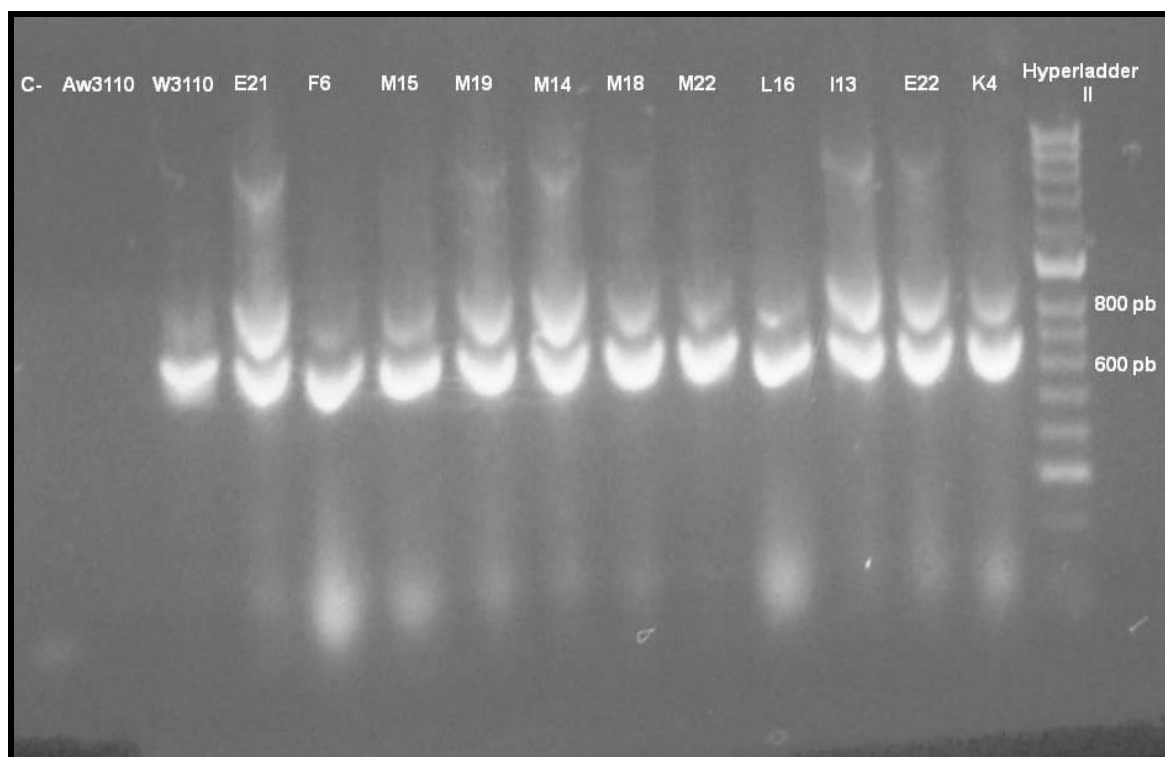


Figura 4-5. Electroforesis en gel de agarosa 1% de ADN total de los clones metagenómicos amplificados con el par de *primers* Ecolimetag (con sitios de corte Tabla 3-1). C-, control negativo; Hyperladder II, marcador molecular (Bioline).

Con los resultados obtenidos en el análisis de SSCP (Figura 4-6) se observó que todas las amplificaciones mostraron un perfil idéntico al del control positivo (cepa W3110) y adicionalmente, en algunos casos (cepas M18, M16, SA, SG, SH, SK, C11, C12, C13, C14, C16 y C1) (Tabla 4-1), se observó un perfil de bandeo más complejo con bandas localizadas arriba y abajo del perfil de bandas obtenido para las demás cepas con perfil idéntico al del control positivo. Este perfil adicional pudo ser ocasionado por una contaminación durante la PCR con estas secuencias en particular, ya que al realizarse las amplificaciones en diferentes *batch* de PCR pudo existir una contaminación de las muestras con ADN no deseado. Por esta razón, se decidió seleccionar aleatoriamente cinco cepas para continuar el estudio (cepas C7, C3, SL, K4 y M19) teniendo como criterio aquellas en las que se veía un perfil de bandeo idéntico a la cepa control, sin bandas adicionales, y se tomó dos de aquellas en las que se veían las bandas no esperadas (cepa M16 y SH).

Se realizó un corte de bandas del gel de SSCP siguiendo el protocolo propuesto por Dohrmann *et al.*, (2004) con el fin de secuenciar tanto la banda superior como la inferior de las 7 cepas seleccionadas (C7, C3, SL, K4, M19, SH y M16). Con los resultados de la secuenciación, se realizó un alineamiento múltiple de las 7 secuencias seleccionadas y se determinó que todas tenían la misma secuencia nucleotídica. Por lo tanto, con la secuencia consenso se realizó un blastx (Figura 4-7) en donde se observa que el gen amplificado corresponde al *arsR* de *E. coli* K12. Al analizar estos resultados es posible afirmar que todos los fragmentos amplificados corresponden al mismo gen *arsR* y que ambos perfiles (banda superior e inferior) del SSCP corresponden al mismo gen.

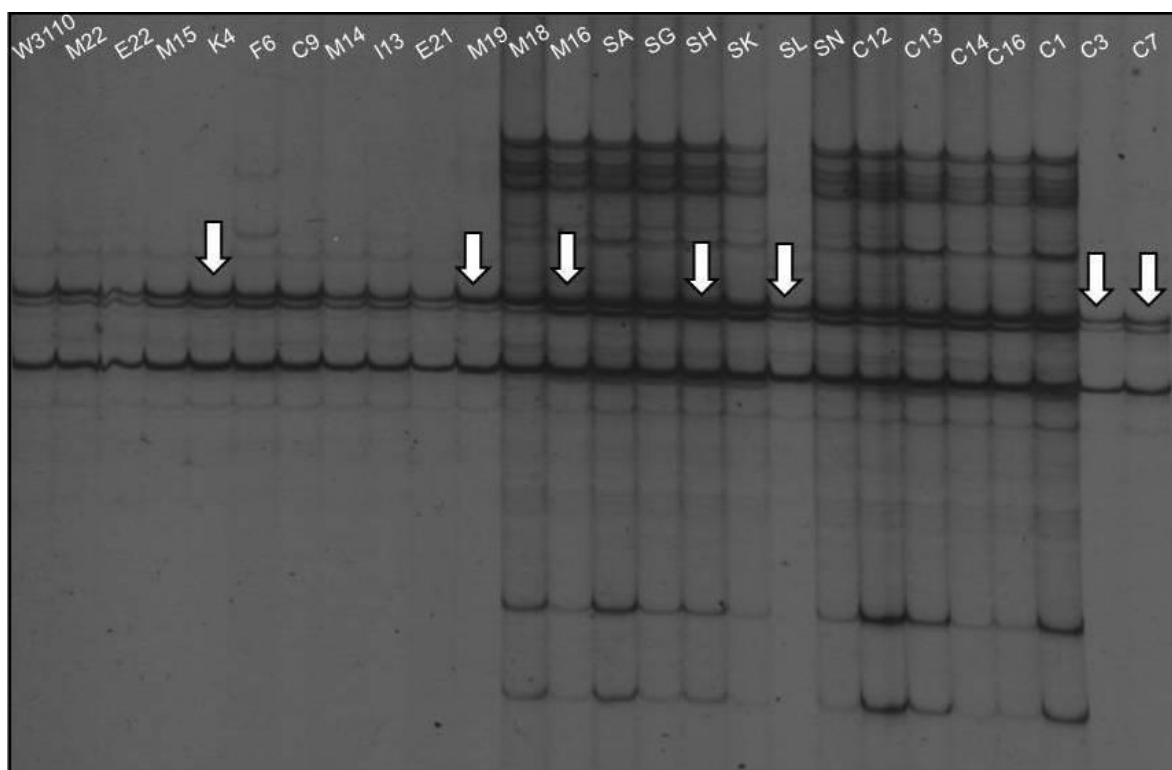


Figura 4-6. Análisis por SSCP de los productos de PCR (genes *arsR*) obtenidos con los *primers* Ecolimetag para los clones metagenómicos y bacterias nativas pertenecientes a la colección de microorganismos resistentes a arsénico del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada, Universidad Nacional de Colombia. Ver anexo B.5 para condiciones de electroforesis. Las flechas blancas indican los perfiles que fueron cortados y purificados para enviar a secuenciación (Macrogen).

DNA-binding transcriptional repressor [Escherichia coli K-12]

Sequence ID: [embICQR82917.1](#) Length: 144 Number of Matches: 1Range 1: 3 to 137 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
278 bits(711)	2e-93	Compositional matrix adjust.	135/135(100%)	135/135(100%)	0/135(0%)	+1
Query 1	LTYPLRRETLPATIRSAICHFCYPSNCSKFLLMKPWASFYCSANWESYASAI SALLSTS				180	
Sbjct 3	LTYPLRRETLPATIRSAICHFCYPSNCSKFLLMKPWASFYCSANWESYASAI SALLSTS				62	
Query 181	RSPRSPATWHCCVKAGYCWTSKVS GFITAYHRIFQHGRKLLMRPGDVNRKRFRRLSAT				360	
Sbjct 63	RSPRSPATWHCCVKAGYCWTSKVS GFITAYHRIFQHGRKLLMRPGDVNRKRFRRLSAT				122	
Query 361	WLDKTVPGTVRTFAV				405	
Sbjct 123	WLDKTVPGTVRTFAV				137	

[Download](#) ▼ [GenPept](#) [Graphics](#)

ArsR family transcriptional regulator [Escherichia coli]

Sequence ID: [ref|WP_000008958.1](#) Length: 121 Number of Matches: 1► [See 3 more title\(s\)](#)Range 1: 1 to 117 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
239 bits(609)	3e-78	Compositional matrix adjust.	117/117(100%)	117/117(100%)	0/117(0%)	+3
Query 54	MSFLLPIQLFKILADETRLGIVLLLSELGELCVCDCLTALDQSQPKISRHLALLRESGLL				233	
Sbjct 1	MSFLLPIQLFKILADETRLGIVLLLSELGELCVCDCLTALDQSQPKISRHLALLRESGLL				60	
Query 234	LDRKQGKWHYRLSPHIPAWAAKIIDEAWRCEQEKVQAIVRNLRQNCSGDSKNICS				404	
Sbjct 61	LDRKQGKWHYRLSPHIPAWAAKIIDEAWRCEQEKVQAIVRNLRQNCSGDSKNICS				117	

Figura 4-7. Análisis blastx de la secuencia consenso del gen *arsR* obtenida con los fragmentos de ADN de las bandas cortadas del gel de SSCP (ver Figura 4-6).

Adicionalmente, con el fin de corroborar que utilizando el ADN obtenido de las bandas cortadas del gel de SSCP se amplificaba el gen *arsR*, se decidió realizar una nueva amplificación por PCR para confirmar los resultados obtenidos durante la secuenciación. Para esto se utilizó como ADN molde los fragmentos cortados del gel de SSCP tanto de bandas superiores como inferiores seleccionadas al azar. En la Figura 4-8 se muestra el gel donde se confirmó que ambos perfiles de bandeos correspondían a la amplificación de las hebras del gen *arsR* de *E. coli*. Teniendo en cuenta que en las 7 cepas seleccionadas el gen *arsR* amplificado fue el mismo, y con el fin de continuar con el ensamblaje del biosensor, se seleccionó el gen *arsR* de la cepa M19 para la construcción de los biosensores para la detección de arsénico, como se describe en la siguiente sección.

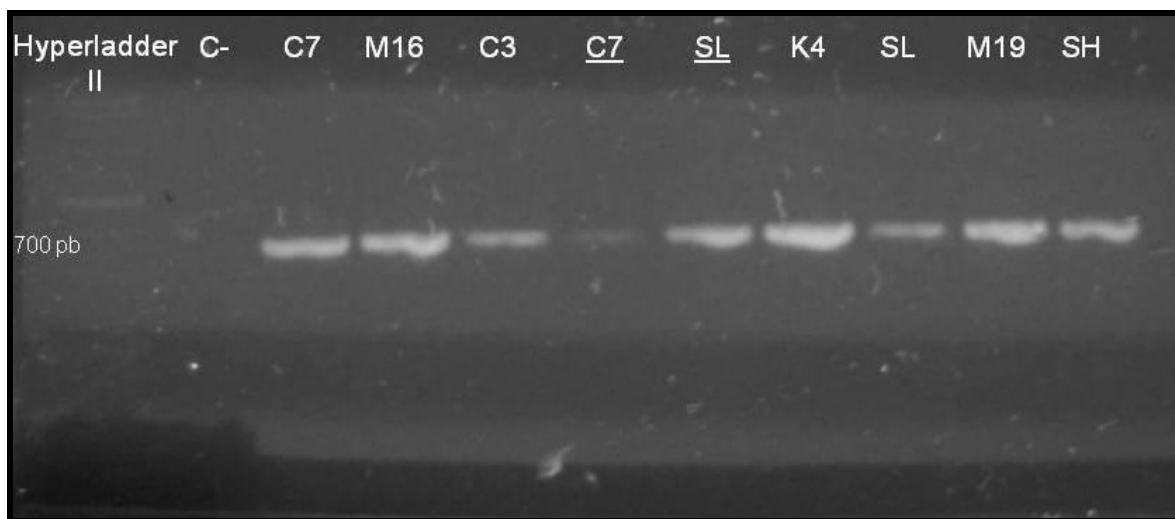


Figura 4-8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de la amplificación del gen *arsR* y promotor, presentes en clones metagenómicos, utilizando ADN obtenido a partir de bandas extraídas del gel de SSCP (ver Figura 4-6). Los códigos de las cepas que se encuentran subrayados fueron amplificados a partir de la banda superior. Los demás fueron amplificados a partir de la banda inferior. C-, control negativo; Hyperladder II, marcador molecular (Bioline).

4.2 Diseño de un biosensor para la detección de arsénico a través del ensamblaje de constructos del gen *arsR* con un gen reportero

4.2.1 Expresión basal de los genes reporteros

Uno de los factores más importantes a la hora de diseñar y ensamblar un biosensor es la selección del gen reportero, ya que este determinará cuál va a ser la respuesta a medir en el sensor ensamblado. Como se mencionó anteriormente, en el diseño de biosensores para la detección de As se han utilizado diferentes tipos de reporteros como el *GFP* ó el gen *lacZ*, entre otros. Se han hecho algunas aproximaciones para determinar la concentración de As de manera sencilla y colorimétrica, como en el estudio de De Mora *et al.*,(2011) en donde el biosensor construido (*arsR* + *lacZ*) funciona con la presencia de arsenito y arsenato que inducen la expresión de la β -galactosidasa, permitiendo la fermentación de lactosa y el subsecuente cambio en el pH que puede ser monitoreado utilizando un indicador de pH. Sin embargo, apenas en el estudio reportado por Yoshida *et al.*, (2008) se propone el uso de un carotenoide que permita visualizar la respuesta del biosensor al “ojo desnudo” sin la necesidad de utilizar reactivos o sustratos adicionales.

Con la intención de utilizar un gen reportero que permita la determinación sencilla de la concentración de As en la muestra y que sea visible al “ojo desnudo”, se seleccionaron para este estudio tres cromoproteínas como genes reporteros: 1) pSB1C3-B0034-amilCP (Morada); 2) pSB1C3-B0034-amilGFP (Amarilla); y 3) pSB1C3-B0034-asPink (Rosada). Estas cromoproteínas fueron obtenidas a partir de corales y anemonas (*Acropora millepora* y *Anemonia sulcata*) y fueron facilitadas por el equipo competidor ante iGEM de la Universidad de Uppsala (iGEM, 2012). Estas cromoproteínas aún se encuentran en estudio, no han sufrido mutaciones para su sobreexpresión y se caracterizan por tener una secuencia de un tamaño aproximado a 700 pb, tener sitios específicos para el reconocimiento de las enzimas *EcoRI*-HF, *SpeI*, *XbaI* y *PstI* fuera de la región codificante (ver mapas plásmidos y secuencias de las cromoproteínas en los Anexos C.1, C.2 y C.3) y expresar color que puede ser detectado a simple vista en un periodo inferior a 24 h.

Para comprobar la expresión basal de cada una de las cromoproteínas y poder identificar tanto los colores, el tiempo de expresión y la facilidad para observarlos, se decidió insertar el gen que codifica para cada una de ellas en el plásmido vector pUC18 sin el gen *arsR*. Posterior a la transformación y a la selección de las bacterias recombinantes, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Figura 4-9**, en donde se puede observar claramente los colores (morado, rosado y amarillo) y fluorescencia (amarilla) expresados por cada una de las respectivas cromoproteínas en un tiempo de incubación de 24 h, tanto en medio líquido (Figura 4-9 A y B) como en medio sólido (Figura 4-9 C y D).

Los resultados obtenidos mostraron claramente (Figura 4-9), que el color expresado es detectable a “simple vista” en las tres cromoproteínas probadas y, adicionalmente, que una de ellas expresa fluorescencia. Por esta razón, se decidió ensamblar tres biosensores (uno con cada cromoproteína) con el fin de determinar en cuál de ellos sería más sencillo detectar el cambio de color a simple vista. Además, con los sensores ensamblados se pretendió realizar una comparación entre la respuesta por fluorescencia vs. color.

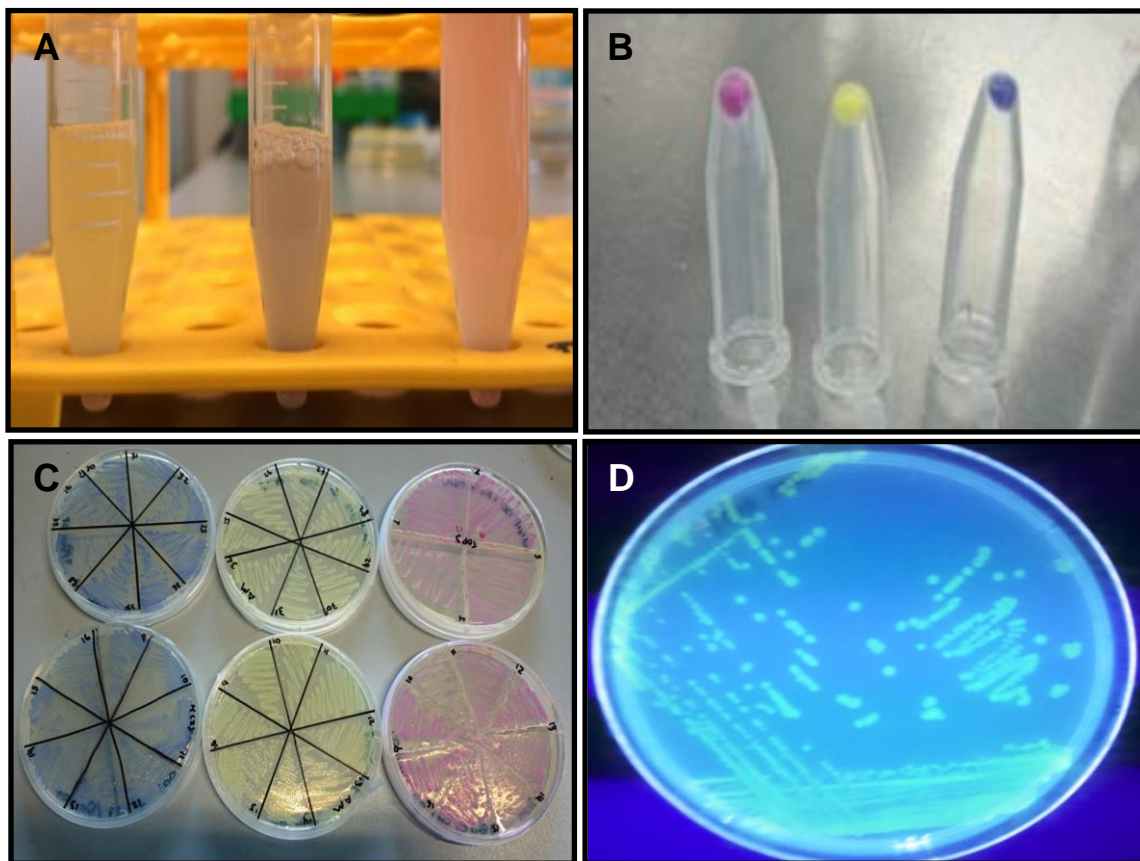


Figura 4-9. Expresión de cada una de las cromoproteínas utilizadas en este trabajo como genes reporteros, después de 24 h de incubación. A) Medio líquido LB+Antibiótico; B) Biomasa celular centrifugada de cultivo líquido LB+Antibiótico; C) Medio sólido LB+Antibiótico; D) Fluorescencia expresada por la cromoproteína pSB1C3-B0034-amiGFP (Amarilla) bajo luz UV en medio sólido LB+Antibiótico. El antibiótico usado fue Ampicilina 10ug/L.

4.2.2 Características del gen *arsR* seleccionado para ensamblaje

Para el ensamblaje del biosensor se seleccionó el gen *arsR* del clon Metagenómico M19 seleccionado al azar a partir de los clones positivos (ver sección 4.1; **Tabla 4-2**) el cual fue amplificado con los *primers* Ecolimetag con sitios de corte (**Tabla 3-1**). El resultado de la amplificación fue positivo, sin embargo, como se mencionó en la sección anterior, se obtuvieron dos fragmentos amplificados (689 pb y 920 pb) como es evidenciado por las dos bandas observadas en el gel de agarosa (**Figura 4-5**).

Con el fin de diferenciar y determinar cuál de los dos fragmentos amplificados se iba a utilizar, se empleó el plásmido pSB1T3-BBa_J044450, que confiere resistencia a tetraciclina (**Anexo C.4**), para insertar cada uno de los fragmentos (del gen *arsR*) amplificados (**Figura 4-5**) y realizar nuevamente una secuenciación de los mismos.

Adicionalmente, una ventaja de este procedimiento fue que al tener el gen *arsR* (parte *upstream*) en un plásmido, permitía una fácil obtención del ADN (gen *arsR*) en mayores cantidades que con la PCR. Esto debido a que al tener el plásmido en una célula huésped se puede realizar una multiplicación de la misma con una gran cantidad de copias del plásmido por célula y realizar digestiones enzimáticas a partir del ADN plásmidico obtenido. Por otro lado, con la PCR se parte de un ADN molde para obtener múltiples copias, por lo cual para tener una gran cantidad del gen deseado se hace necesario realizar varias reacciones de PCR.

El plásmido pSB1T3-BBa_J044450 utilizado expresa normalmente una cromoproteína rosada (Figura 4-10 A) y los sitios de corte para las enzimas de restricción se encuentran en la mitad de este gen (Anexo C.4). Por lo tanto, cuando hay una inserción positiva en el plásmido se observan colonias blancas (Figura 4-10 B) que permiten la selección de las bacterias recombinantes.

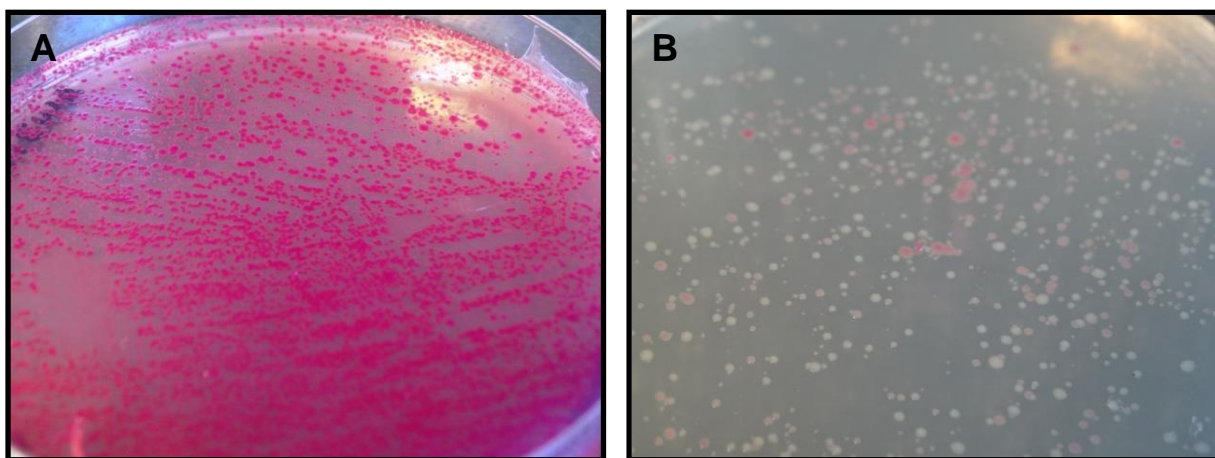


Figura 4-10. Selección de colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido pSB1T3-BBa_J044450 que confiere resistencia a tetraciclina. A) Colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido sin inserto (colonias rosadas); B) Colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido con el gen *arsR* insertado (colonias blancas).

Los recombinantes denominados *E. coli* TOP10-arsRTet5 (inserto de 920 pb; Anexo C.6) y *E. coli* TOP10-arsRTet12 (inserto de 689 pb; Anexo C.7) fueron obtenidos con la inserción de los fragmentos de diferentes tamaños (*arsR*) en el plásmido de tetraciclina y sus secuencias fueron analizadas. Con los resultados de la secuenciación y al realizar el análisis blastn y blastx para cada uno de los fragmentos (Figura 4-11 y Figura 4-12), se puede observar que en ambos casos el gen amplificado e insertado corresponde al gen

arsR de *E. coli* K12. Una región diferencial de aproximadamente 200 pb, fue identificada en el extremo 3' de la secuencia del inserto de 920 pb. Un mapeo de esta región sobre el genoma de *E. coli* K12 permitió identificar que esta secuencia corresponde a una región intrónica “aguas arriba” del gen *arsR* y su promotor (Figura 4-13).

Con los datos obtenidos a partir de la secuenciación de los dos fragmentos (689 y 920 pb) y después de realizar los análisis bioinformáticos mostrados en las figuras (Figura 4-11, Figura 4-12 y Figura 4-13), se realizó una comparación de dichas secuencias con el gen *arsR* descrito por otros autores (Diorio *et al.*, 1995; Stolz *et al.*, 2011). Para ambas amplificaciones las secuencias coinciden en un 100 % con la secuencia reportada, incluyendo la región intrónica mencionada anteriormente. Los *primers* diseñados en el presente estudio amplifican en la parte *upstream* una región intrónica “aguas arriba” del gen *arsR* y su promotor (Figura 4-13 B y C), y en la parte *downstream* a partir de una región interna del gen *arsB* (Figura 4-13 D), cumpliendo así con el primer objetivo planteado: amplificar el gen *arsR* y su promotor (Figura 4-13 C) de ADN de bacterias autóctonas de Colombia con resistencia a arsénico.

A *Escherichia coli* K-12 strain ER3435, complete genome
 Accession ID: [gb|CP010445.1|](#) Length: 4682086 Number of Matches: 3

Range 1: 4446613 to 4447533 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1690 bits(915)	0.0	919/921(99%)	0/921(0%)	Plus/Minus

Features: [ArsR family transcriptional regulator](#)
[arsenical pump membrane protein](#)

Query 7 ACTCCAGCCGATGCCTAAACCTTTTCGGCTGCCAGATAACCAATACGATGGTCAGGACAAA 66
 Sbjct 4447533 ACTCCAGCCGATGCCTAAACCTTTTCGGCTGCCAGATAACCAATACGATGGTCAGGACAAA 4447474

Query 67 GATAGCGCTGCCAGTAACATAATGCCTCCCGGATAAAACACATCTGAAAAATTCATATGT 126
 Sbjct 4447473 GATAGCGCTGCCAGTAACATAATGCCTCCCGGATAAAACACATCTGAAAAATTCATATGT 4447414

Query 127 GTTTAGCTAAATTTTAACTGCAAAATGTTCTTACTGTCCCCGGAACAGTTTGTGCGAGCC 186
 Sbjct 4447413 GTTTAGCTAAATTTTAACTGCAAAATGTTCTTACTGTCCCCGGAACAGTTTGTGCGAGCC 4447354

Query 187 AGGTTGCGGACAATCGCCTGAACCTTTTCTGTTACATCGCCAGGCTCATCAATAATT 246
 Sbjct 4447353 AGGTTGCGGACAATCGCCTGAACCTTTTCTGTTACATCGCCAGGCTCATCAATAATT 4447294

Query 247 TTCGCCGCCCATGCTGGAATATGCGGTGATAAGCGGTAAATGAACCCACTTACCTTGCTTG 306
 Sbjct 4447293 TTCGCCGCCCATGCTGGAATATGCGGTGATAAGCGGTAAATGAACCCACTTACCTTGCTTG 4447234

Query 307 CGGTCCAGCAATAGCCCGCTTTCACGACGCAATGCCAGGTGGCGGGAGATCTTGGGCTGC 366
 Sbjct 4447233 CGGTCCAGCAATAGCCCGCTTTCACGACGCAATGCCAGGTGGCGGGAGATCTTGGGCTGC 4447174

Query 367 GACTGGTCGAGAGCAGTGACAGAGATCGCAGACGCATAACTCTCCAGTTTCGCTGAGCAGT 426
 Sbjct 4447173 GACTGGTCGAGAGCAGTGACAGAGATCGCAGACGCATAACTCTCCAGTTTCGCTGAGCAGT 4447114

Query 427 AAAACGATGCCAGACGGGTTTCATCAGCAAGAATTTGAACAATTGGATGGGTAAACAGA 486
 Sbjct 4447113 AAAACGATGCCAGACGGGTTTCATCAGCAAGAATTTGAACAATTGGATGGGTAAACAGA 4447054

Query 487 AATGACATATTGCGCTTCTGATTGTTGACGGTAGTGTCTCTCTCGAAGCGGATAAGTCA 546
 Sbjct 4447053 AATGACATATTGCGCTTCTGATTGTTGACGGTAGTGTCTCTCTCGAAGCGGATAAGTCA 4446994

Query 547 AAAACATATATGACTTAACGAATGTGTAAGTGCAGAGGAAGGTAATAGGTGTGAATTTTG 606
 Sbjct 4446993 AAAACATATATGACTTAACGAATGTGTAAGTGCAGAGGAAGGTAATAGGTGTGAATTTTG 4446934

Query 607 AGTTGGCTATTCAATTTGAAAGGAGGTCTGAATCAGGACGTaaaaaaCCGACTTTGCGTC 666
 Sbjct 4446933 AGTTGGCTATTCAATTTGAAAGGAGGTCTGAATCAGGACGTAAAAAACCGACTTTGCGTC 4446874

Query 667 GGTTTTTACTTTCCAGCCCTGAGTTGGTGGCTCTGGCTGGAGTGAGAGAGTTCTTATCT 726
 Sbjct 4446873 GGTTTTTACTTTCCAGCCCTGAGTTGGTGGCTCTGGCTGGAGTGAGAGAGTTCTTATCT 4446814

Query 727 AACAGCTCAATACTATTAGCCAGTGGCTAACATTGCAAGAATTAGCGATTCTTCAGCTG 786
 Sbjct 4446813 AACAGCTCAATACTATTAGCCAGTGGCTAACATTGCAAGAATTAGCGATTCTTCAGCTG 4446754

B [Download](#) [▼](#) [GenPept](#) [Graphics](#)

DNA-binding transcriptional repressor [Escherichia coli K-12]
 Sequence ID: [emb|CQR82917.1|](#) Length: 144 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 144 [GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
297 bits(761)	5e-98	Compositional matrix adjust.	144/144(100%)	144/144(100%)	0/144(0%)	-2

Query 553 MFLTYPLRRETLPATIRSAICHFCYPSNCSKFLMKPVWASFYCSANNESYASISALLS 374
 MFLTYPLRRETLPATIRSAICHFCYPSNCSKFLMKPVWASFYCSANNESYASISALLS
 Sbjct 1 MFLTYPLRRETLPATIRSAICHFCYPSNCSKFLMKPVWASFYCSANNESYASISALLS 60

Query 373 TSRSRSPATWHCCVKAGYCHTASKVSGFITAYHRIFQHGRRKLLMRPGDVNRKFRRLS 194
 TSRSRSPATWHCCVKAGYCHTASKVSGFITAYHRIFQHGRRKLLMRPGDVNRKFRRLS
 Sbjct 61 TSRSRSPATWHCCVKAGYCHTASKVSGFITAYHRIFQHGRRKLLMRPGDVNRKFRRLS 120

Query 193 ATWLDKTVPGTVRTFAVKNLAKHI 122
 ATWLDKTVPGTVRTFAVKNLAKHI
 Sbjct 121 ATWLDKTVPGTVRTFAVKNLAKHI 144

Figura 4-11. Análisis blast con el gen *arsR* metagenómico de 920 pb. A) análisis blastn; B) análisis blastx.

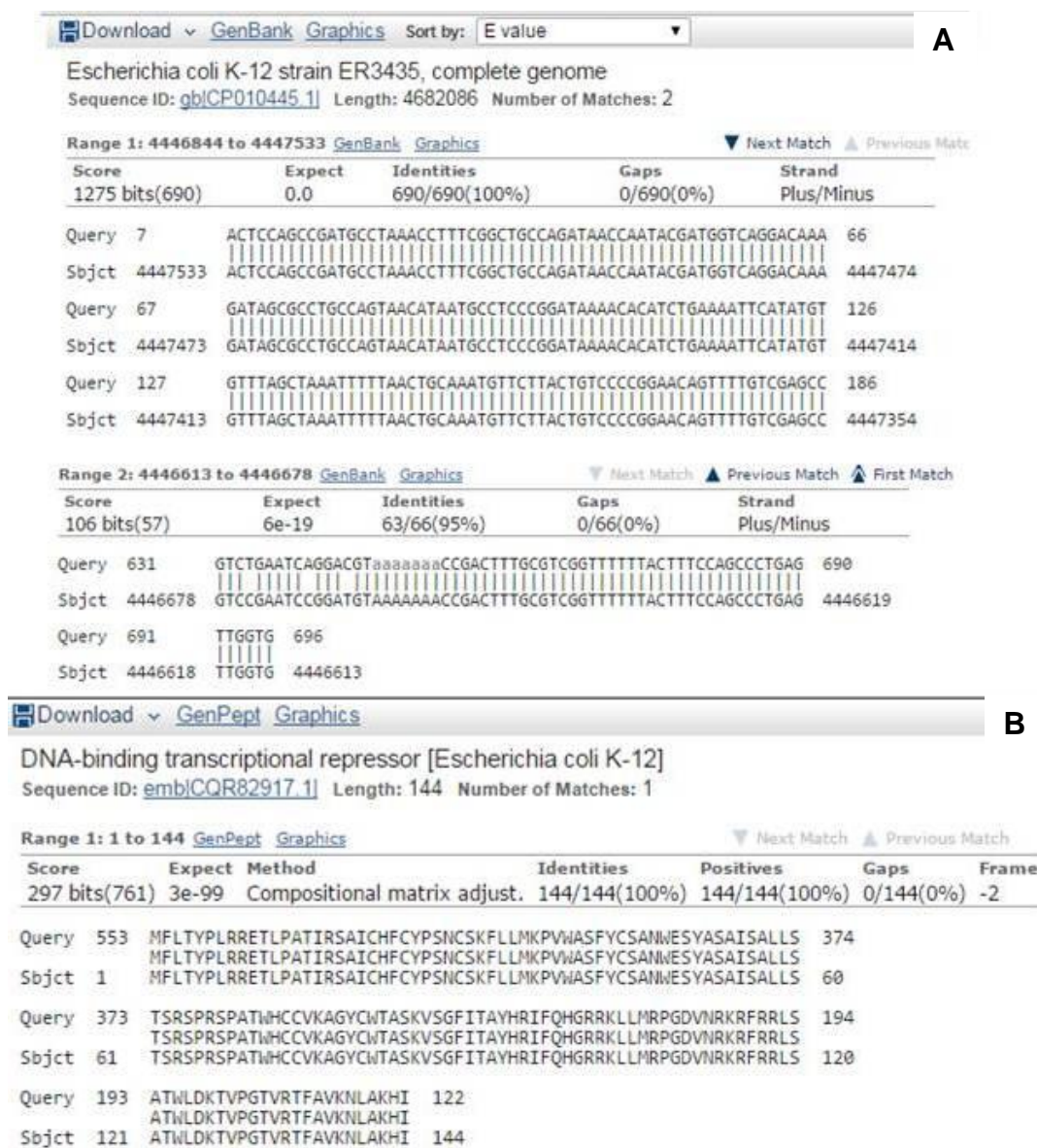


Figura 4-12. Análisis blast con el gen *arsR* metagenómico de 689 pb. A) Análisis blastn; B) análisis blastx.

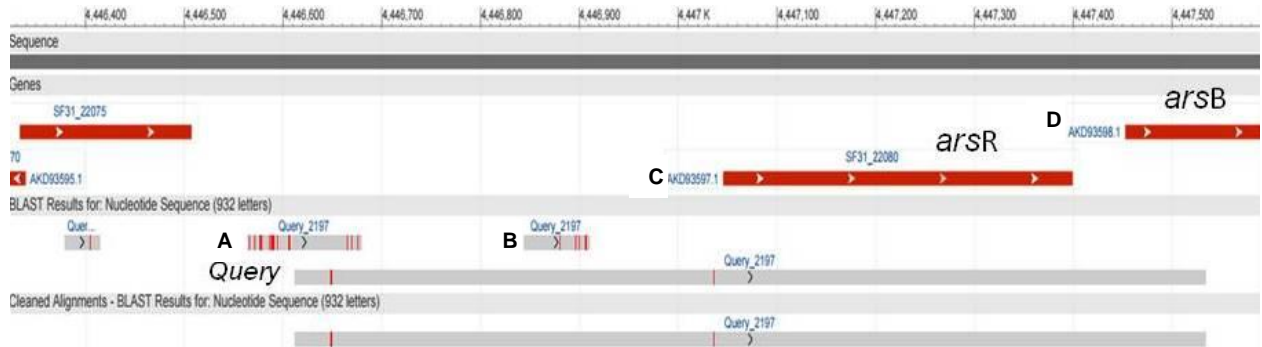


Figura 4-13 Mapeo en el genoma de *E. coli* K12 con la secuencia del gen *arsR* de 920 pb del recombinante denominado *E. coli* TOP10-*arsRTet5*. Las secciones A y B corresponden a regiones intrónicas dentro de la secuencia amplificada. La región C corresponde a la amplificación del exón que codifica a partir del gen *arsR* junto con su promotor y la sección D corresponde a la amplificación de una región del exón que codifica para *ArsB*.

4.2.3 Ensamblaje de los biosensores para la detección de arsénico utilizando cromoproteínas como sistema reportero

Debido a los resultados obtenidos en el numeral anterior (dos tamaños del mismo gen *arsR*) se realizó una prueba de ensamblaje con la cromoproteína morada para determinar cuál de los insertos (inserto de 920 pb o de 689 pb) sería utilizado para el ensamblaje de los demás biosensores. Después de varios intentos, únicamente se obtuvieron resultados positivos (colonias con color morado en presencia de As(III) y con banda de tamaño esperado) en las ligaciones y transformaciones realizadas con el gen *arsR* del recombinante denominado *E. coli* TOP 10-*arsRTet 5* (con el inserto de 920 pb). Estos resultados posiblemente pueden deberse a que cuando se realizaron las ligaciones con el fragmento de 689 pb se afectó el marco abierto de lectura y por lo tanto no se codifica para las proteínas deseadas (*ArsR* y cromoproteínas). Debido a estos resultados se seleccionó el inserto de 920 pb para realizar el ensamblaje de todos los biosensores.

Una vez definida la parte *upstream* (gen *arsR*), el ensamblaje de los biosensores de As fue realizado utilizando como parte *downstream* las cromoproteínas descritas en el numeral 4.2.1. Se utilizó como metodología general la descrita en el Biobrick assembly kit® (New England Biolabs inc.), el cual fue propuesto por Knight (2003) con el fin de estandarizar el ensamblaje de partes en dispositivos y sistemas biológicos. Esta metodología tiene como ventaja que todas las partes ensambladas por este

procedimiento serán compatibles y fácilmente modificables a futuro (Knight, 2003). El ensamblaje se basa en la utilización de enzimas de restricción diferentes que flanquean cada una de las partes a insertar (Figura 3-2). En las partes *upstream* o prefijos, se encuentran sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, mientras que en las partes *downstream* o sufijos, se encuentran los sitios de corte para las enzimas *SpeI* y *PstI*. De esta forma los sitios generados para *EcoRI* y *PstI* permiten la transferencia de las partes (genes) de un vector a otro, mientras que los sitios de restricción de *XbaI* y *SpeI* generarán extremos adherentes que al ligarse producirán un sitio mixto o “cicatriz” con la secuencia característica “ACTAGA” que no será reconocida por ninguna de las dos enzimas (*Mixed site*) (Ho-Shing *et al.*, 2012).

Para ensamblar los biosensores que se mencionan a continuación se utilizó: 1) como gen de reconocimiento al As, el gen *arsR* de *E. coli* K12, el cual se encontraba en el inserto de 920 pb del recombinante denominado *E. coli* TOP10-*arsRTet5*; 2) como genes reporteros se utilizaron las tres cromoproteínas (Morada, rosada y amarilla) descritas en la sección 4.2.3; y 3) como vector de clonación se utilizó el plásmido pUC18. Se ensambló un total de 3 biosensores: 1) BASmor: gen *arsR* + cromoproteína morada pSB1C3-B0034-amilCP + pUC18; 2) BASros: gen *arsR* + cromoproteína rosada pSB1C3-B0034-asPink (Rosada) + pUC18; y 3) BASama: gen *arsR* + cromoproteína amarilla pSB1C3-B0034-amilGFP + pUC18 (Figura 4-14). En la Figura 4-15 se observa una digestión enzimática de los plásmidos contruidos (biosensores ensamblados) con cada una de las cromoproteínas seleccionadas. En los carriles 2, 4 y 6 se observan los plásmidos linearizados y en los carriles 3, 5 y 7 se observa el inserto libre que corresponde al gen *arsR* junto con cada una de las cromoproteínas. Al analizar este gel de electroforesis, se puede observar que cada una de las bandas obtenidas corresponde a los resultados esperados: tamaño del constructo alrededor de 4200 pb (pUC18 + gen *arsR* de 920 pb + Cromoproteína) y la liberación del inserto alrededor de los 1600 pb (gen *arsR* de 920 pb + Cromoproteína). Por esta razón se enviaron a secuenciar los insertos de cada uno de los biosensores para la detección de arsénico ensamblados.

Al analizar los resultados de las secuencias de cada constructo se confirmó que las ligaciones se habían realizado de manera exitosa y adecuada, que se encontraba en la secuencia el sitio mixto y que no se afectaron los ORF's durante la ligación. Con los datos obtenidos, se procedió a ensamblar *in silico* cada uno de los biosensores (Figura 4-14 y Anexos C.8, C.9 y C.10). Se confirmó que se encontraban presentes las

secuencias -35 (TTGACT) y -10 (GACACT) las cuales son secuencias de reconocimiento para la RNA polimerasa ubicadas “aguas arriba” del promotor y el codón de inicio ATG del gen *arsR* + promotor en cada uno de los biosensores. De esta forma, los biosensores quedaron ensamblados para las siguientes pruebas de expresión bajo diferentes concentraciones de arsénico.

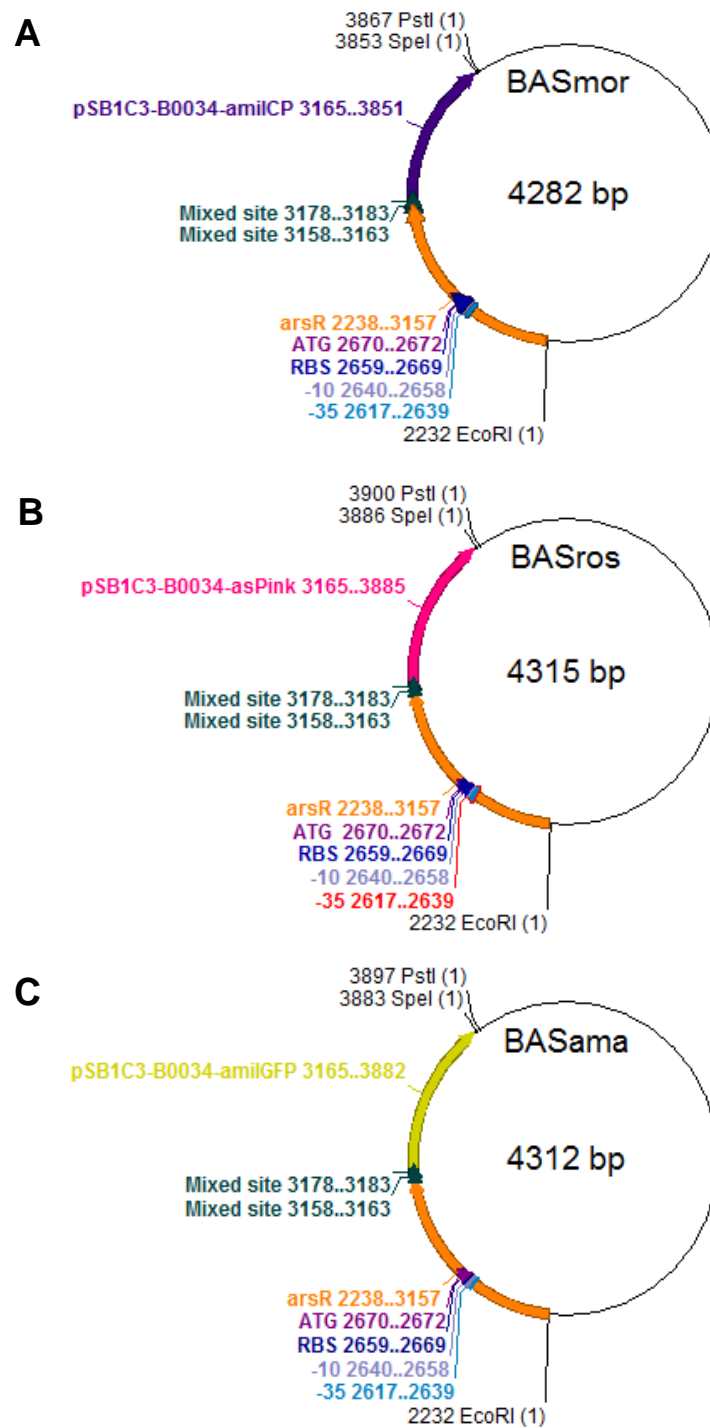


Figura 4-14. Mapas de los plásmidos construidos con pUC18 + gen *arsR* (de 920 pb) + cromoproteína reportera. A) Biosensor de arsénico morado (BASmor); B) Biosensor de arsénico rosado (BASros); C) Biosensor de arsénico amarillo (BASama).

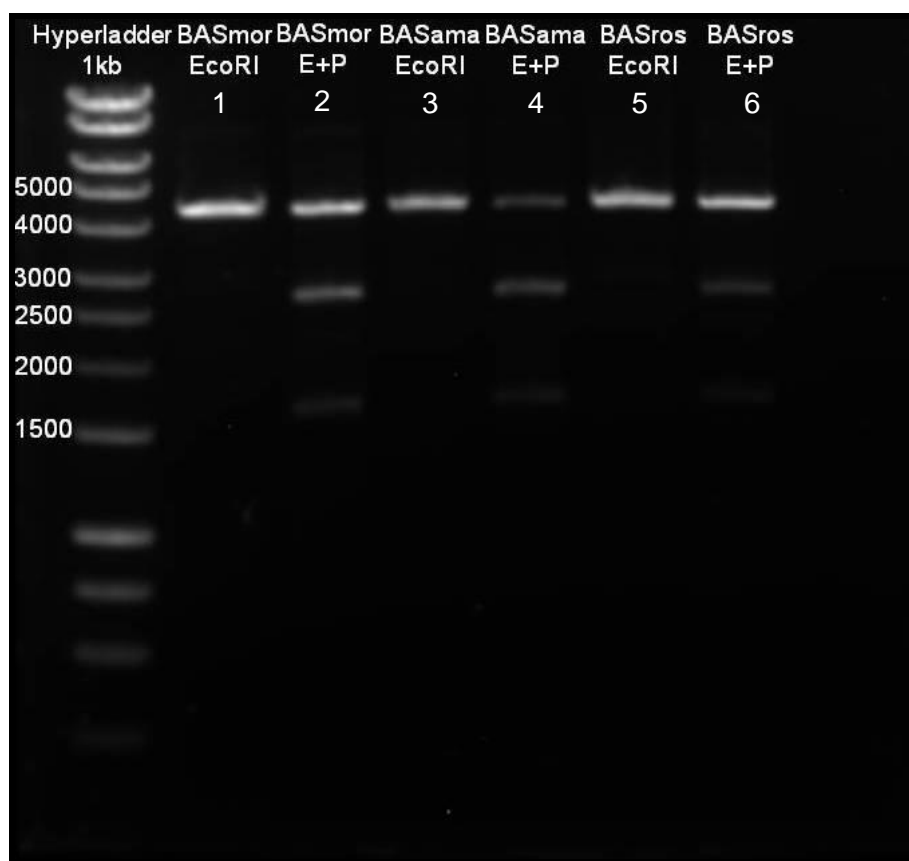


Figura 4-15. Electroforesis de gel de agarosa 1 % de la digestión enzimática de los biosensores BASmor, BASama y BASros ensamblados. Carriles 2, 4 y 6: digestión con *EcoRI*-HF; Carriles 3, 5 y 7: digestión con *EcoRI*-HF (E) y *PstI* (P); Carr 1: marcador molecular Hyperladder 1 kb (Bioline).

4.3 Evaluación de los biosensores ensamblados a nivel de laboratorio y con distintas concentraciones de As

Una vez ensamblados los 3 biosensores para la detección de As [BASmor: gen *arsR* + cromoproteína morada pSB1C3-B0034-amilCP + pUC18; BASros: gen *arsR* + cromoproteína rosada pSB1C3-B0034-asPink + pUC18; y BASama: gen *arsR* + cromoproteína amarilla pSB1C3-B0034-amilGFP + pUC18 (Figura 4-14)], se realizaron ensayos cualitativos preliminares con el fin de establecer las condiciones de cultivo adecuadas para evaluar los biosensores en diferentes concentraciones de As. Este procedimiento fue realizado debido a que las cromoproteínas empleadas como sistema reportero aún se encuentran en estudio y porque se ha observado que diferentes variables (p.e.: longitud de onda a la que se somete el cultivo durante su crecimiento; temperatura; tiempo de incubación) afectan la expresión del color.

4.3.1 Selección de condiciones de cultivo para ensayos con el biosensor BASmor a diferentes concentraciones de As: evaluación cualitativa

La evaluación y selección de las condiciones de cultivo adecuadas para la expresión y evaluación del color de los BAS ensamblados se realizó únicamente con el BASmor debido a que en un comienzo se consideró que las condiciones escogidas para este biosensor podrían funcionar adecuadamente para el cultivo y evaluación del BASros.

En primer lugar se comenzó por definir si se utilizaría medio LBA+Ampicilina en estado sólido o líquido suplementado con diferentes concentraciones de As(III), esto debido a que en los ensayos realizados con las cromoproteínas (Figura 4-9) el color era detectable a simple vista en ambos medios de cultivo. En la Figura 4-16 se puede observar el crecimiento y color del cultivo del BASmor después de 48 h de incubación en los diferentes estados del medio (sólido o líquido). Una vez finalizado el tiempo de incubación, en el medio líquido (Figura 4-16 A) no era perceptible un cambio de color del cultivo en las diferentes concentraciones de As(III), razón por la cual se centrifugó el cultivo para determinar si en la biomasa recolectada se observaba un cambio de color (Figura 4-16 B). Sin embargo, en ninguno de los dos casos hubo cambio de color en la biomasa respecto a la concentración de As(III).

En cuanto al cambio de color en cultivos realizados en medio sólido (Figura 4-16 C y Figura 4-16 D), finalizado el tiempo de incubación en ambas siembras (aislamiento y siembra masiva), se puede observar que el cultivo adquiere una tonalidad gris, sin embargo no es perceptible el cambio de color (morado) entre las diferentes concentraciones de As(III) presentes en el medio. Debido a esto, se decidió recolectar con una punta de micropipeta blanca una parte de la biomasa (Figura 4-16 E), y se observó un cambio en el color del cultivo respecto a las diferentes concentraciones de As(III), lo que confirmó el correcto funcionamiento del sensor. Para poder observar mejor este cambio de color, se distribuyó la biomasa recolectada en una hoja de papel blanco (Figura 4-16 E), y en este caso el cambio de color del BASmor en las diferentes concentraciones de As(III) fue claramente perceptible “al ojo desnudo”.

Este comportamiento (donde se observa cambio de color únicamente en medio sólido con presencia de As) puede deberse a que en el cultivo líquido, por la agitación y libertad

de las células en el medio, los nutrientes y el As presentes en el cultivo se encuentran en contacto más frecuente con la biomasa comparado con el medio sólido, situación que puede conllevar a que el metaloide esté interactuando intracelularmente con la cromoproteína de una manera distinta a como ocurre cuando el cultivo se realiza en medio sólido (Stanier *et al.*, 2005). Adicionalmente, es posible que este comportamiento ocurra debido a la forma en la cual se realizó el ensayo: en la evaluación en medio líquido, el microorganismo se ve enfrentado a un contacto repentino con el metaloide cuando ya se encuentra en fase exponencial, mientras que en el cultivo en medio sólido el microorganismo debe volver a crecer bajo las condiciones de estrés [presencia de As(III)], situación que puede estar afectando la expresión de las cromoproteínas. Debido a estos resultados, es conveniente plantear futuras investigaciones que evalúen la producción de la cromoproteína cambiando las condiciones de estudio y evaluar la interacción entre los metales y las cromoproteínas utilizadas como sistema reportero, para determinar si esto es lo que está causando el comportamiento observado.

Teniendo en cuenta que el cambio de color en el biosensor únicamente se observaba a simple vista en medio sólido, se definió para los ensayos posteriores que el cultivo se realizaría en agar LBA+Ampicilina y la biomasa sería recolectada para poder determinar el cambio de color en las diferentes concentraciones de As.

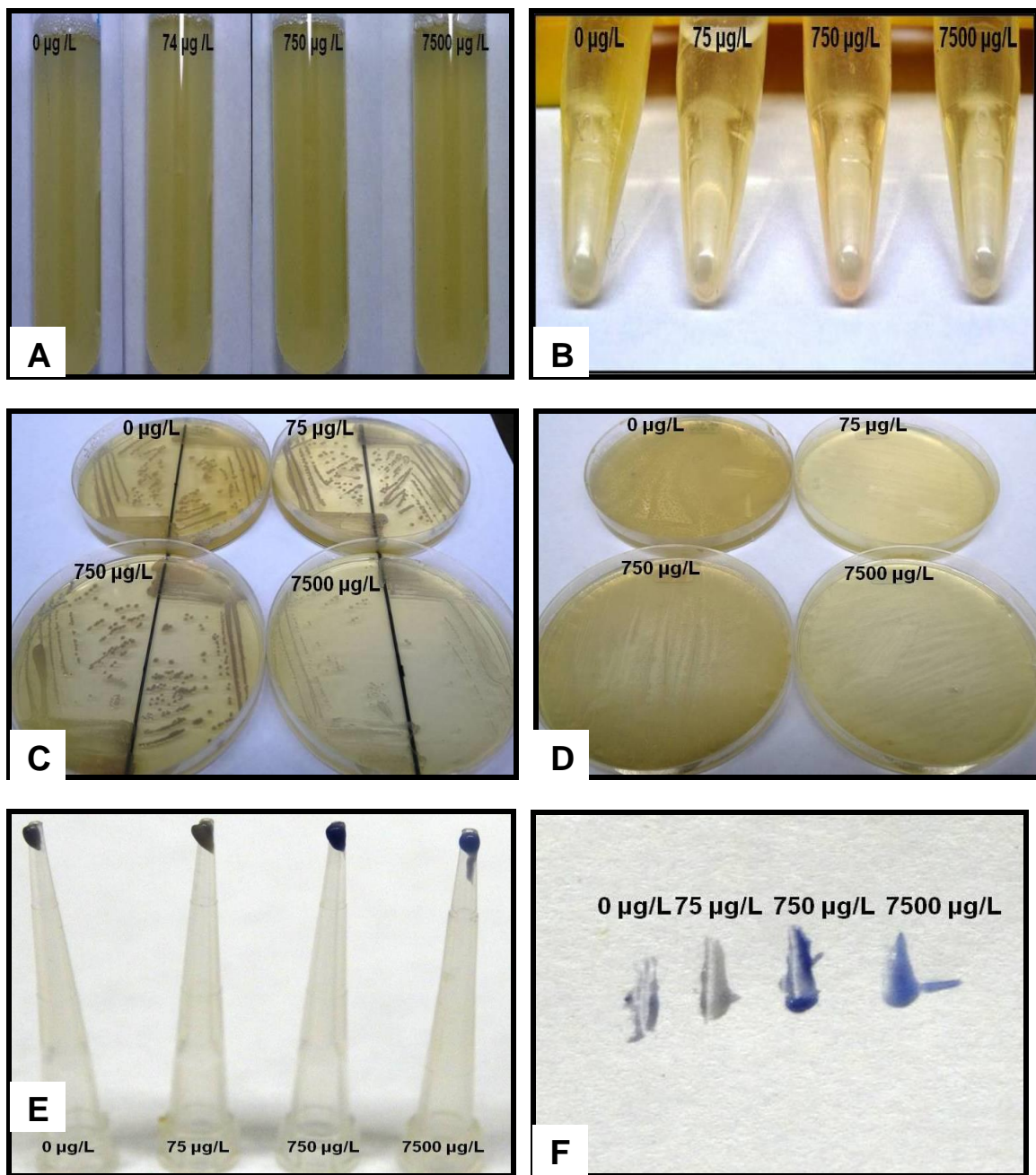


Figura 4-16. Evaluación cualitativa de BASmor descrita en la sección 3.5.2 - Ensayo A. Selección de condiciones de cultivo medio sólido vs. Líquido a diferentes concentraciones de As(III) en $\mu\text{g/L}$. Resultados obtenidos después de 48 h de incubación en medio LBA+Ampicilina. A) Crecimiento en medio LBA líquido; B) Biomasa- *pellet* obtenido a partir de la centrifugación del cultivo líquido; C) Aislamiento realizado en agar LBA; D) Cultivo masivo realizado en agar LBA; E) A partir del cultivo masivo de la imagen D se utilizó una punta de micropipeta y se recolectó la biomasa que se observa en la figura; F) La biomasa bacteriana recogida en la imagen E se distribuyó en una hoja de papel blanco.

Posteriormente, se decidió evaluar si la expresión del color dependía de la temperatura de incubación durante el periodo de inducción. Por lo tanto, se realizaron los cultivos con las condiciones establecidas previamente en medio sólido, se sometió el BASmor a diferentes temperaturas de inducción (T. ambiente de Bogotá de ~20 °C, 30°C y 37°C) y se monitoreó el cambio de color a simple vista a las 24 y 48 h de incubación. Como se puede observar en la Figura 4-17 A.1 y Figura 4-17 A.2, a las 24 horas de inducción el cambio de color morado fue fácilmente detectable en la temperatura de 37 °C. Esto puede deberse a que esta es la temperatura óptima de crecimiento de *E. coli*, por lo cual la cantidad de proteína reportera producida es mayor bajo esta condición en un menor tiempo.

Es importante mencionar que a las 48 h de cultivo (Figura 4-17 B.1 y Figura 4-17 B.2) el cambio de color fue perceptible en todas las temperaturas y su intensidad mayor que la obtenida a las 24 h. Esto, probablemente se debe a que el BASmor ha producido mayor cantidad de cromoproteína y esta ha tenido mayor tiempo para completar sus procesos de maduración y plegamiento. Adicionalmente, a las 48 h la linealidad en el cambio de color respecto a la concentración de As(III) se observó claramente a T. ambiente, situación que podría ser conveniente para futuros estudios e implementaciones del sensor en campo, ya que no se requeriría de un equipo de incubación para las muestras.

Para este estudio y los ensayos presentados a continuación se seleccionó como temperatura de incubación 37 °C y como tiempo adecuado para realizar la evaluación de color las 24 h. Se definieron estas condiciones porque esta es la temperatura que permite observar un cambio de color respecto a la concentración de As en un menor tiempo.

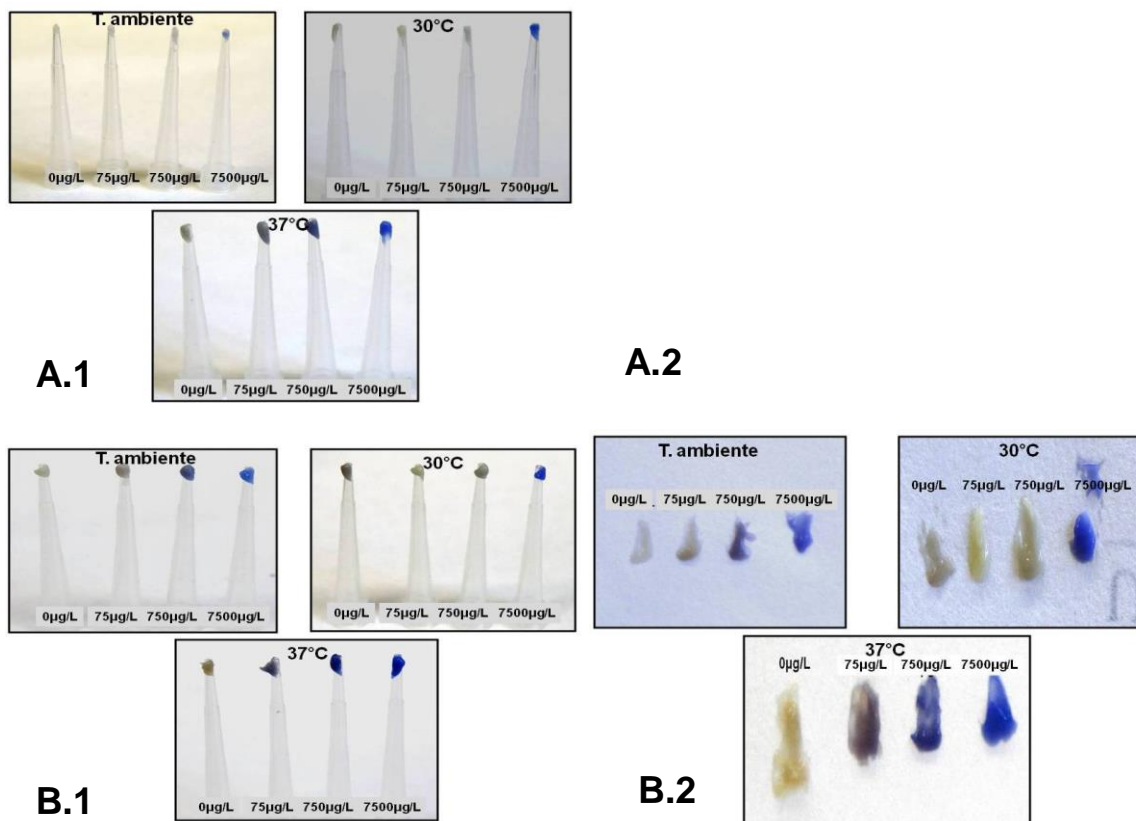


Figura 4-17. Evaluación cualitativa del biosensor BASmor descrita en la sección 3.5.2 - Ensayo B. Selección de condiciones de cultivo a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación, a diferentes concentraciones de As(III) en $\mu\text{g/L}$. A) A partir de una siembra masiva del cultivo se utilizó una punta de micropipeta y se recolectó la biomasa que se observa en la figura después de 24 h de incubación (A.1), y posteriormente se distribuyó la biomasa en una hoja de papel blanco (A.2); B) A partir de una siembra masiva del cultivo se utilizó una punta de micropipeta y se recolectó la biomasa que se observa en la figura después de 48 h de incubación (B.1), y posteriormente se distribuyó la biomasa en una hoja de papel blanco (B.2).

Una vez establecido el medio de cultivo, el tiempo y la temperatura de incubación, se evaluó si la expresión del color variaba en diferentes condiciones de luz. Esto se realizó debido a que en el estudio de (Verkhusha, Chudakov, *et al.*, 2004) se reporta que la formación de los cromóforos y su subsecuente percepción a simple vista (color observado) puede ser alterada empleando diferentes longitudes de onda.

Para este ensayo se probaron únicamente dos condiciones: luz blanca y oscuridad. En la Figura 4-18 se puede observar que, en general, en ambas condiciones el cambio de color respecto a la concentración de As(III) es perceptible a simple vista. Sin embargo, en oscuridad (**Figura 4-18 A**) la linealidad en el cambio del color es mayor a la del cultivo expuesto a luz blanca (**Figura 4-18 B**), en el cual a concentraciones de 7500 $\mu\text{g As(III)/L}$ el color es más intenso que en concentraciones más elevadas (75000 $\mu\text{g As(III)/L}$). Por esto, se estableció que para los posteriores ensayos la incubación se realizaría en condiciones de oscuridad.

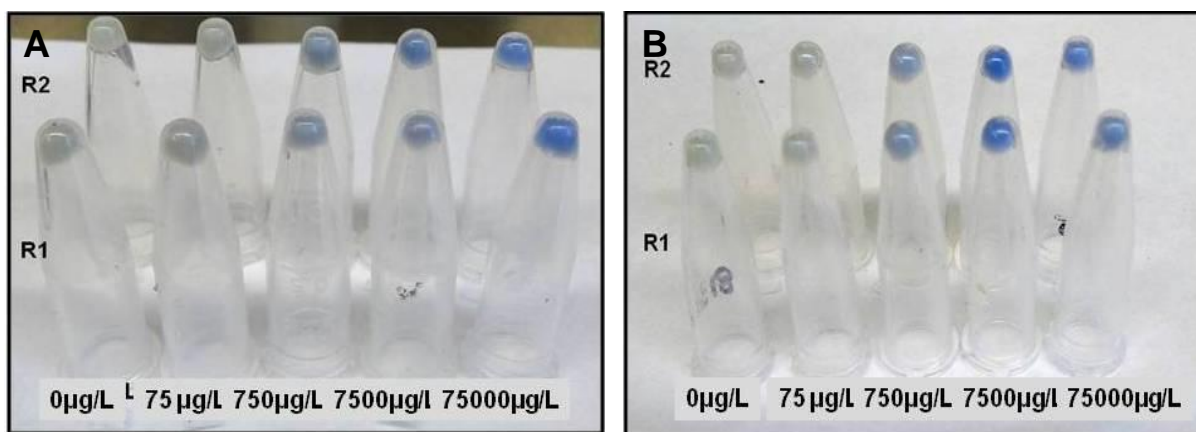


Figura 4-18. Ensayo cualitativo del biosensor BASmor descrito en la sección 3.5.2 - Ensayo C. Evaluación de la producción de color a diferentes condiciones de luz durante incubación del cultivo a diferentes concentraciones de As(III) en $\mu\text{g/L}$. Fotografía tomada después de 24 h a 37 °C. A) Cultivo incubado en oscuridad; B) Cultivo incubado con luz blanca; R1 y R2: replicas en $\mu\text{g/L}$ de cada una de las concentraciones de As(III).

4.3.2 Evaluación colorimétrica de los biosensores BASmor y BASros bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio

Como se mencionó anteriormente, en los biosensores para la detección de As ensamblados hasta la fecha (Tabla 1-1), se requieren sustratos costosos para la detección de la proteína reportera producida o equipos de medición para la misma. Motivos que hacen necesaria la búsqueda y el diseño de sistemas (biosensores o bioreporteros) que permitan una identificación fácil, rápida y sin costos adicionales de la concentración de As presente en el medio. En este estudio se propuso como una posible solución a estos inconvenientes el uso de cromoproteínas como sistema reportero. Las ventajas de este sistema radican en que su detección se puede realizar “al ojo desnudo” sin la necesidad de adicionar sustratos al medio, lo que cual permite disminuir costos a la hora de idear un producto comercial y permite que personal no capacitado en áreas como la microbiología puedan realizar una evaluación cualitativa de una muestra desconocida.

En la sección 4.3.1 se seleccionaron las condiciones de crecimiento e incubación para realizar los ensayos bajo diferentes concentraciones de As. A continuación se presentan los resultados obtenidos para los dos biosensores que expresan color (BASmor y BASros) evaluados con As(III), As(V) y Sb(III) en diferentes concentraciones de cada uno de los metaloides.

- **Evaluación colorimétrica del biosensor de arsénico BASmor bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio**

Del set de tres biosensores ensamblados en este trabajo, a continuación se presentan los resultados obtenidos bajo diferentes concentraciones de As(III), As(V) y Sb(III) con el BASmor (gen *arsR* + cromoproteína morada pSB1C3-B0034-amiCP + pUC18). Para estos ensayos se siguió el protocolo descrito en la sección 3.5.3 en donde el cultivo se realiza en medio sólido y una vez finalizado el tiempo de incubación se recolecta la biomasa para evaluar el cambio de color cualitativamente y, posteriormente, realizar una evaluación de la diferencia entre el color de las células expuestas al metaloide utilizando el colorímetro de mesa ColorQuest XE (Hunterlab). Los colores basados en los espectros de luz transmitida a través de los cultivos se representaron en el sistema CIE-L*a*b (McLaren, 1976). El espacio de color CIE-L*a*b es un sistema general para medir color

en objetos y permite establecer diferencias entre colores. En este espacio de color las coordenadas de L^* y a^*b^* son expresadas como valores referentes de luminosidad y *chroma*, respectivamente. Un incremento en el valor de a^* a partir del centro del espacio de color hacia una dirección positiva indica un incremento en el *chroma* rojo, y un incremento en el valor de a^* desde el centro del espacio hacia una dirección negativa indica un aumento en el *chroma* verde. Una variación en el valor de b^* en una dirección positiva indica el incremento del *chroma* amarillo mientras que un aumento en la dirección negativa indica el incremento del *chroma* azul (Figura 4-19).

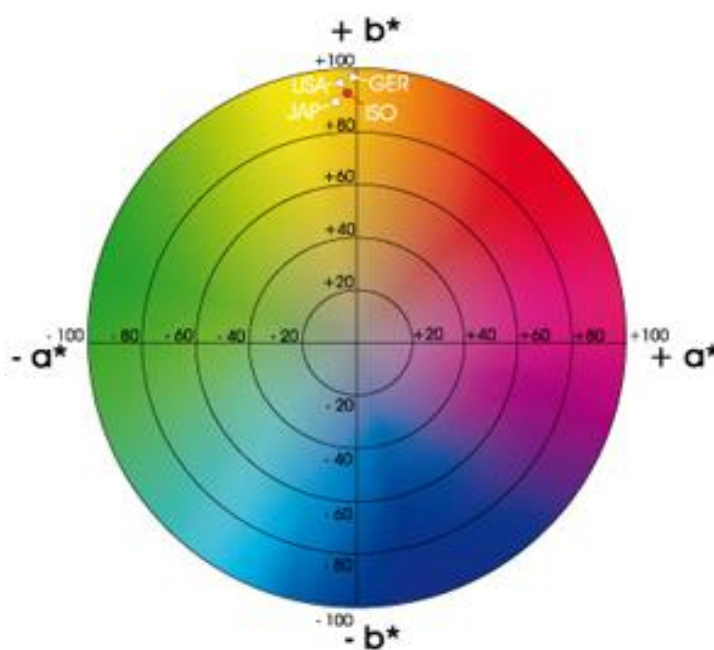


Figura 4-19. Espacio de color del sistema CIE- $L^*a^*b^*$. Tomado de ISO (2006)

En el BASmor bajo diferentes concentraciones de As(III) ($75 \mu\text{g/L}$ – $374.600 \mu\text{g/L}$; Figura 4-20), se observa claramente, y sin necesidad de equipos, que el arsenito induce satisfactoriamente la expresión de la cromoproteína dependiendo de la concentración de metaloide presente en el medio, siendo detectable por un cambio en el color o tonalidad morada del cultivo. Al analizar cada uno de los puntos con el colorímetro de mesa (Figura 4-21), en donde se espera que a mayor concentración de As(III) presente en la muestra aumenten los valor de $-b^*$ (aumento en el *chroma* azul), se pudo observar una clara tendencia al aumento de la tonalidad morada que corresponde a los tonos observados en la Figura 4-20.

En general, tanto en el análisis cualitativo como en el cuantitativo el comportamiento del biosensor BASmor en las diferentes concentraciones de As(III) es positivo. Se puede observar (Figura 4-20 y Figura 4-21) que la respuesta en el cambio de color aumenta hasta alcanzar una concentración de 37.460 µg/L y a partir de este punto el arsénico comienza a ser tóxico para las células, generando una inhibición del cultivo y por lo tanto una disminución en la producción de la cromoproteína y de la correspondiente disminución de intensidad de color en el medio. Esta situación es similar a la reportada por (Liao *et al.*, 2005), cuyo biosensor tiene como constructo el gen *arsR* de *S. aureus* junto con la proteína GFP y en el cual, a concentraciones mayores a 750 µg As(III)/L, se observó un decrecimiento en las unidades de fluorescencia. Al comparar la respuesta de los dos biosensores, el BASmor presenta una respuesta lineal a mayores concentraciones de As(III) presentes en el medio (Liao *et al.*, 2005) lo cual es útil si se pretende realizar una medición de As(III) en aguas contaminadas con alta presencia del metaloide, teniendo en cuenta que el límite máximo de detección de este sistema es de 37.460 µg As(III)/L.

Por otro lado, para que el cambio de color pueda ser visto en el BASmor, se requieren grandes cantidades de arsenito presentes en el medio, lo cual es una desventaja en este sistema ya que lo ideal sería obtener un límite de detección de 10 µg/L o inferior. Esta situación puede deberse a la manera en la cual está diseñado este ensayo. Como se mencionó anteriormente, este se realiza en medio sólido donde el acceso a los nutrientes y, en este caso, al metaloide es menor comparado con el cultivo líquido, lo que implica que se necesitan mayores concentraciones de As(III) en el medio para producir un cambio.

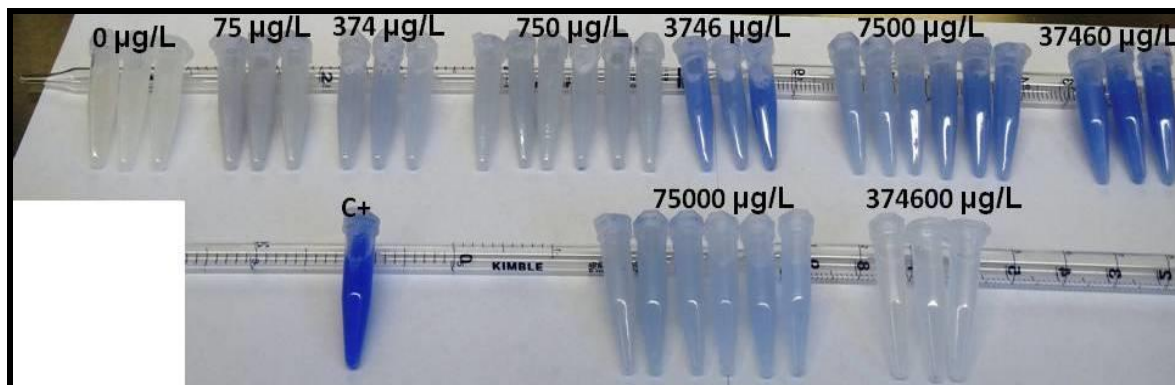


Figura 4-20. Cambio de color del biosensor BASmor bajo diferentes concentraciones de As(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. La biomasa fue resuspendida en medio mínimo M9 para realizar las lecturas colorimétricas (ver Figura 4-21). (C+): corresponde al crecimiento y expresión del color del recombinante *E.coli*-TOP10+cromoproteína sin el gen *arsR*, o sea, expresión de la cromoproteína sin regulación génica (ver sección 4.2.1).

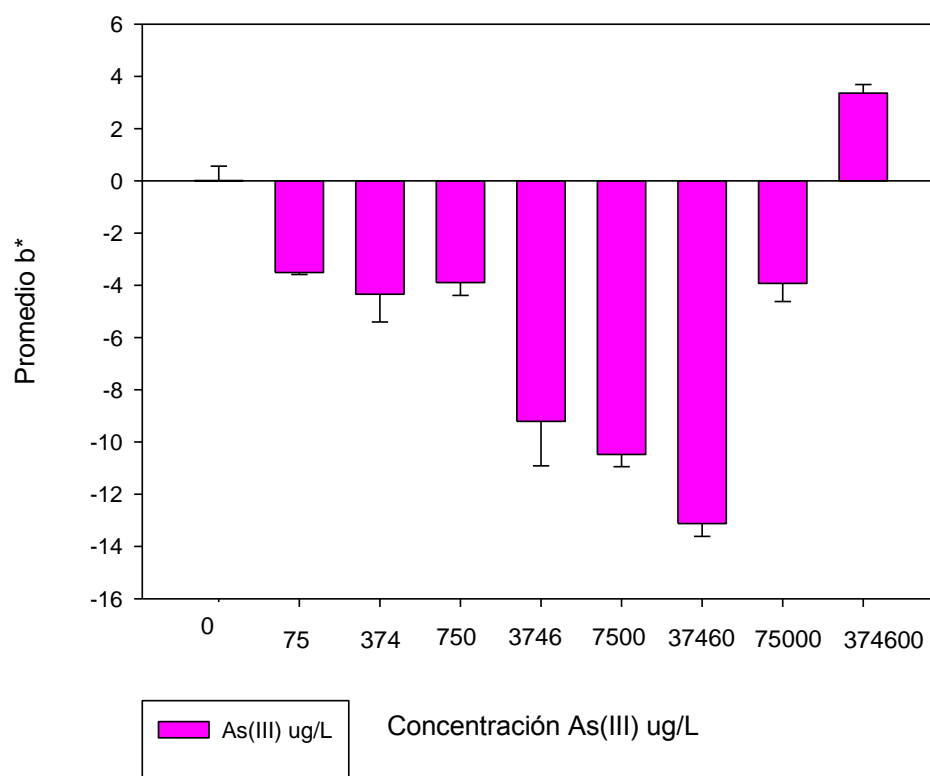


Figura 4-21. Evaluación colorimétrica del biosensor BASmor en diferentes concentraciones de As(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. Lecturas realizadas con un colorímetro de mesa ColorQuest XE (Hunterlab).

Al probar el BASmor con diferentes concentraciones de As(V) (75 µg/L – 750.000 µg/L) se obtuvo un comportamiento similar al ensayo con arsenito (Figura 4-22 y Figura 4-23). El color morado aumentó gradualmente (aumento de $-b^*$ en la Figura 4-23) hasta que el metaloide empezó a ser tóxico para la célula, momento en el cual comienza a disminuir el crecimiento celular y por lo tanto la producción de la cromoproteína. Sin embargo, utilizando este estado de oxidación del metaloide se requiere aún una concentración más alta del mismo (concentraciones superiores a 3746 µg As(V)/L) para obtener una respuesta. Este comportamiento ya ha sido reportado en varios biosensores (Ramanathan *et al.*, 1998; Stocker *et al.*, 2003) y se le ha atribuido a la afinidad que tiene el ArsR por el arsenito, la cual es mayor que por el arsenato ocasionando que se requiera una mayor concentración de As(V) para inducir la respuesta deseada (Ramanathan *et al.*, 1998).

Por otro lado, se conoce que la proteína ArsR tiene afinidad tanto por iones de As como por iones de Sb(III) (Carlin *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 2013). En la mayoría de biosensores ensamblados se realiza una prueba con diferentes concentraciones de antimonio con el fin de determinar la respuesta del biosensor a la presencia de este metaloide, encontrando que el Sb(III) produce una respuesta similar a la generada por el As(III) (Kaur *et al.*, 2015; Ramanathan *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1997; Tauriainen *et al.*, 1997). Al realizar el ensayo con el biosensor BASmor y diferentes concentraciones de Sb(III) se observó (Figura 4-24 y Figura 4-25) que no hubo una respuesta en el cambio de color respecto a las diferentes concentraciones de Sb(III) presentes en el medio. Esta situación puede deberse a que, en este caso, la afinidad de ArsR por el Sb(III) es menor a la afinidad que tiene por el As(III), situación similar al estudio realizado por (Ivanina *et al.*, 2009) donde fueron requeridas altas concentraciones (>400 µg/L) de Sb(III) para generar una respuesta en el biosensor ensamblado. Adicionalmente, en el caso del BASmor, en donde las células deben crecer en presencia del metaloide, la falta de color puede deberse a la alta toxicidad del metaloide sobre las células. Carlin *et al.* (1995) reportó que se requiere una menor concentración de Sb(III) en el medio para causar la misma toxicidad que el As(III). Esto fue comprobado en la recolección de las muestras para realizar las mediciones de color una vez que el Sb(III) generó una alta inhibición en los cultivos, encontrándose que a concentraciones de 5000 µg/L prácticamente no se observó crecimiento celular. Esta situación se ve reflejada en los valores de b^* observados en la Figura 4-25 y motivo por el cual no se probaron concentraciones

superiores de este metaloide. Esta falta de respuesta en presencia de Sb(III) es una ventaja en el sistema ensamblado, pues de esta manera los iones de Sb(III) no serán interferentes en las mediciones de As(III) y As(V) en una muestra de agua.

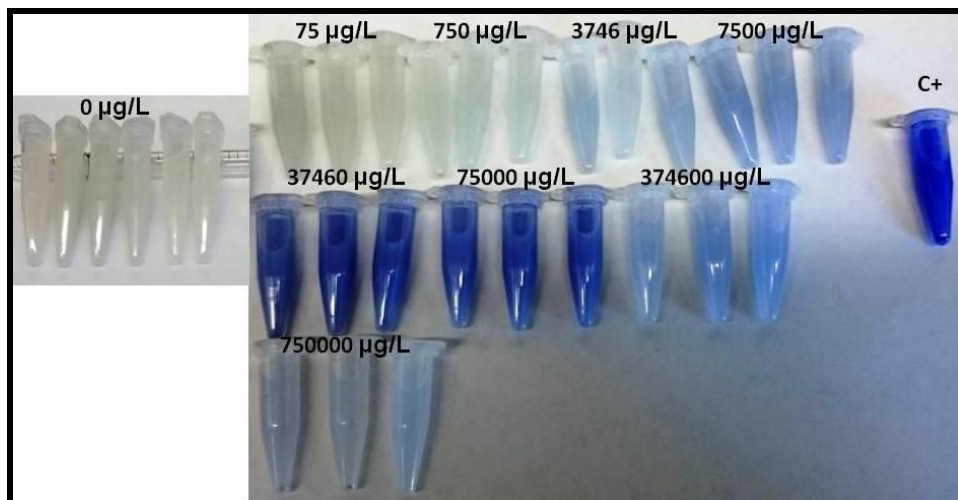


Figura 4-22. Cambio de color del biosensor BASmor bajo diferentes concentraciones de As(V) después de 24 h de incubación a 37°C en oscuridad. La biomasa fue resuspendida en medio mínimo M9 para realizar las lecturas colorimétricas (ver Figura 4-23). (C+): corresponde al crecimiento y expresión del color del recombinante *E.coli*-TOP10+cromoproteína sin el gen *arsR*, o sea, expresión de la cromoproteína sin regulación génica (ver sección 4.2.1).

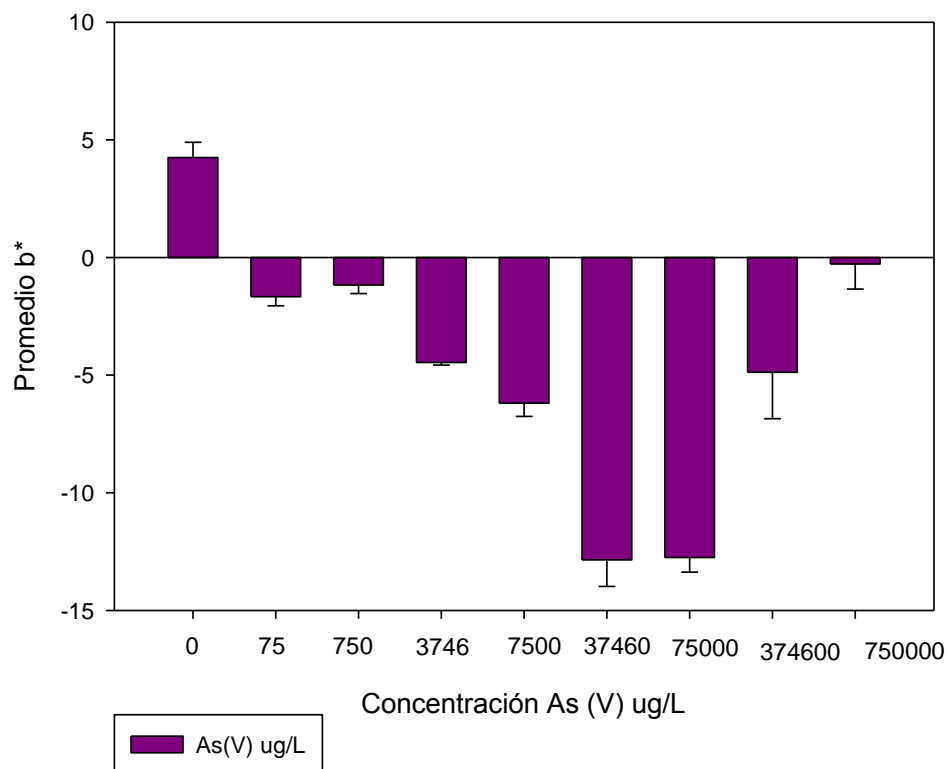


Figura 4-23. Evaluación colorimétrica del biosensor BASmor en diferentes concentraciones de As(V) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. Lecturas realizadas con un colorímetro de mesa ColorQuest XE (Hunterlab).

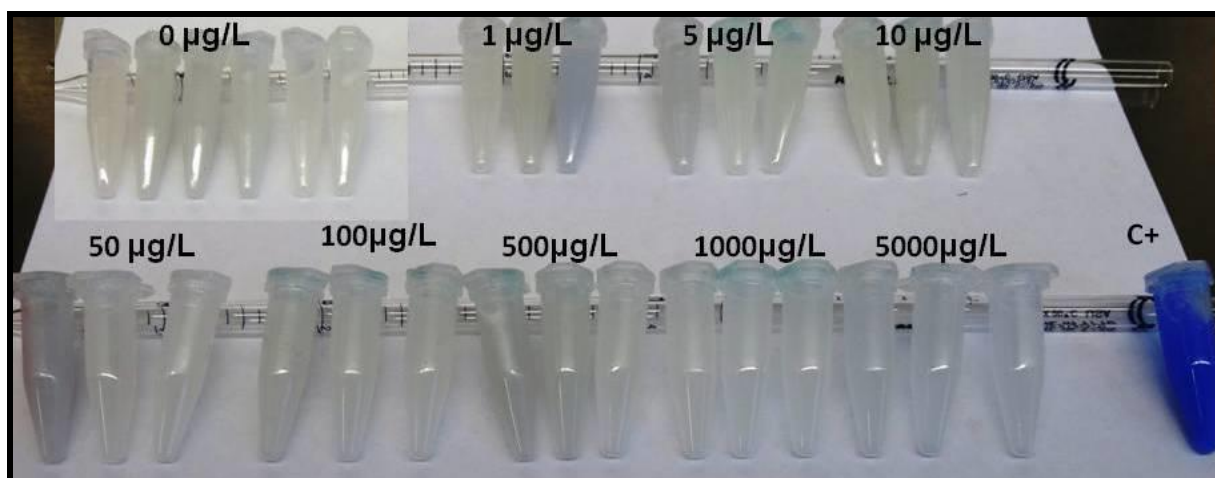


Figura 4-24. Cambio de color del biosensor BASmor bajo diferentes concentraciones de Sb(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. La biomasa fue resuspendida en medio mínimo M9 para realizar las lecturas colorimétricas (ver Figura 4-25). (C+): corresponde al crecimiento y expresión del color del recombinante *E.coli*-TOP10+cromoproteína sin el gen *arsR*, o sea, expresión de la cromoproteína sin regulación génica (ver sección 4.2.1).

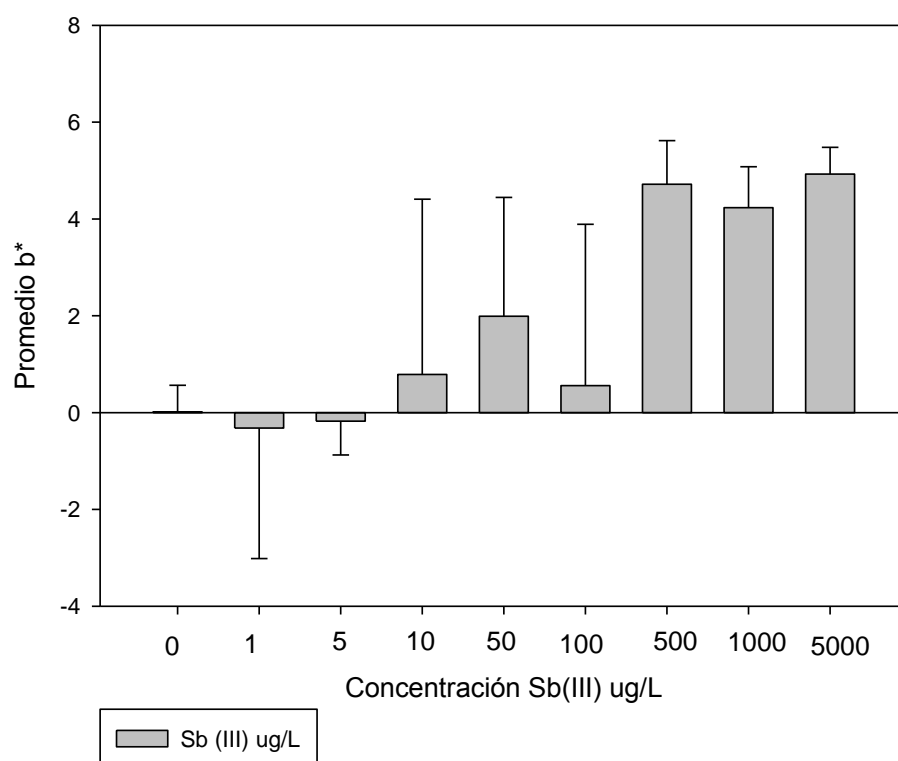


Figura 4-25. Evaluación colorimétrica del biosensor BASmor en diferentes concentraciones de Sb(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. Lecturas realizadas con un colorímetro de mesa ColorQuest XE (Hunterlab).

De los biosensores a As ensamblados hasta la fecha (Tabla 1-1), el único diseño que ha utilizado un reportero que se puede observar a simple vista sin la necesidad de utilizar equipos o sustratos adicionales para obtener una respuesta, es el realizado por Yoshida *et al.* (2008) en donde se utiliza un carotenoide (gen *crtl*) como proteína reportera. Al comparar el comportamiento de este biosensor con el biosensor BASmor se concluye que, en ambos, el cambio de color es perceptible a simple vista, ventaja que ofrecen estos dos sistemas contra otros como lo son los que requieren un equipo para medir la respuesta (fluorescencia). En ambos biosensores, el tiempo de inducción es de 24 horas, un tiempo prolongado si se compara con otros mecanismos de respuesta como los del GFP y *lux*, motivo por el cual se hace necesario realizar estudios que permitan obtener un cambio de color en un tiempo inferior. Ahora bien, las ventajas del biosensor BASmor respecto al biosensor diseñado por Yoshida *et al.* (2008) son que en el primero no se observa interferencia por parte de los iones de Sb(III), que el cultivo bacteriano es de crecimiento rápido y que no requiere de un medio de cultivo de requerimientos nutricionales muy específicos, como si lo requiere el biosensor de Yoshida *et al.* (2008).

- **Evaluación colorimétrica del biosensor de arsénico BASros bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio**

De las tres cromoproteínas utilizadas como genes reporteros para el ensamblaje de los biosensores a As, la única que ha sido estudiada en algunos aspectos es la pSB1C3-B0034-asPink (rosada) o también conocida como asFP595 (Lukyanov *et al.*, 2000). Esta cromoproteína presenta una característica especial y es que según la longitud de onda de excitación, la respuesta colorimétrica puede convertirse en fluorescencia (Schäfer *et al.*, 2008). Sin embargo, este mecanismo aún no está completamente elucidado, por lo cual se han intentado realizar mutaciones sobre los tres aminoácidos (MYG) que conforman el cromóforo (Wilmann *et al.*, 2005).

Para realizar los ensayos con el biosensor BASros en diferentes concentraciones de As(III), As(V) y Sb(III) se siguió el protocolo descrito en la sección 3.5.3, en donde el cultivo se realiza en medio sólido y una vez finalizado el tiempo de incubación se recolecta la biomasa para evaluar el cambio de color cualitativamente. Posteriormente, se realizó una evaluación de la diferencia entre el color de las células expuestas al metaloide utilizando el colorímetro de mesa ColorQuest XE (Hunterlab). En las lecturas realizadas con este sensor se espera que a mayor concentración de As presente en la

muestra aumenten los valor de $+a^*$ (aumento en el *chroma* rojo) ya que se aumentará el color rosado.

A la hora de analizar los resultados obtenidos al someter el biosensor BASros a diferentes concentraciones de As(III) (Figura 4-26 y Figura 4-27), As(V) (Figura 4-28 y Figura 4-29) y Sb(III) (Figura 4-30), no se logra establecer diferencias en el color producido en cada una de las concentraciones de los metaloides. Estos resultados pueden atribuirse principalmente a que las condiciones que se utilizaron para la realización de estos ensayos fueron las establecidas para el biosensor BASmor. Esto indica que se hace necesario estudiar cuales condiciones son mejores para aumentar la expresión de la respuesta producida por el biosensor BASros como lo son, por ejemplo, el tiempo de inducción, la temperatura, las condiciones del cultivo (liquido vs. sólido) y la longitud de onda durante la incubación de las células.

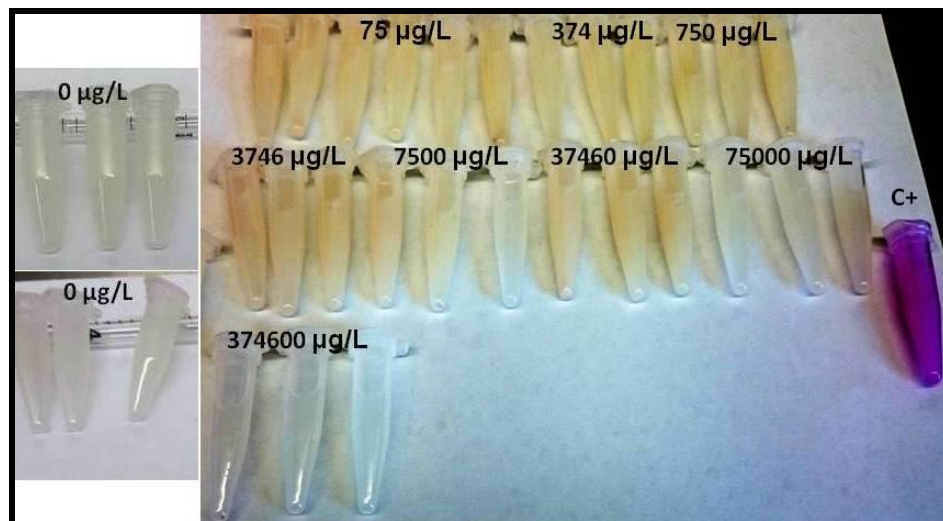


Figura 4-26. Cambio de color del biosensor BASros bajo diferentes concentraciones de As(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. La biomasa fue resuspendida en medio mínimo M9 para realizar las lecturas colorimétricas (ver Figura 4-27). (C+): corresponde al crecimiento y expresión del color del recombinante *E.coli*-TOP10+cromoproteína sin el gen *arsR*, o sea, expresión de la cromoproteína sin regulación génica (ver sección 4.2.1).

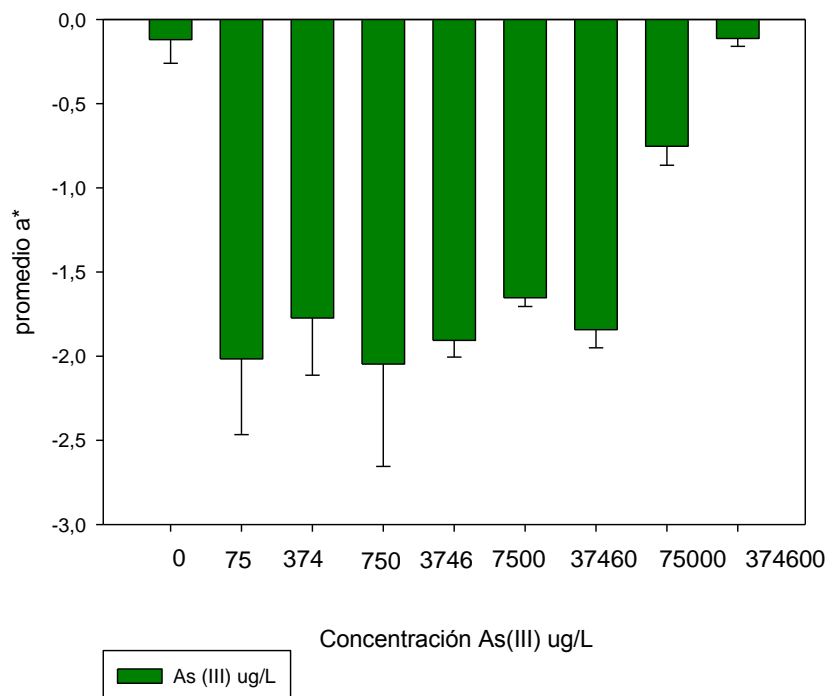


Figura 4-27. Evaluación colorimétrica del biosensor BASros en diferentes concentraciones de As(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. Lecturas realizadas con un colorímetro de mesa ColorQuest XE (Hunterlab).

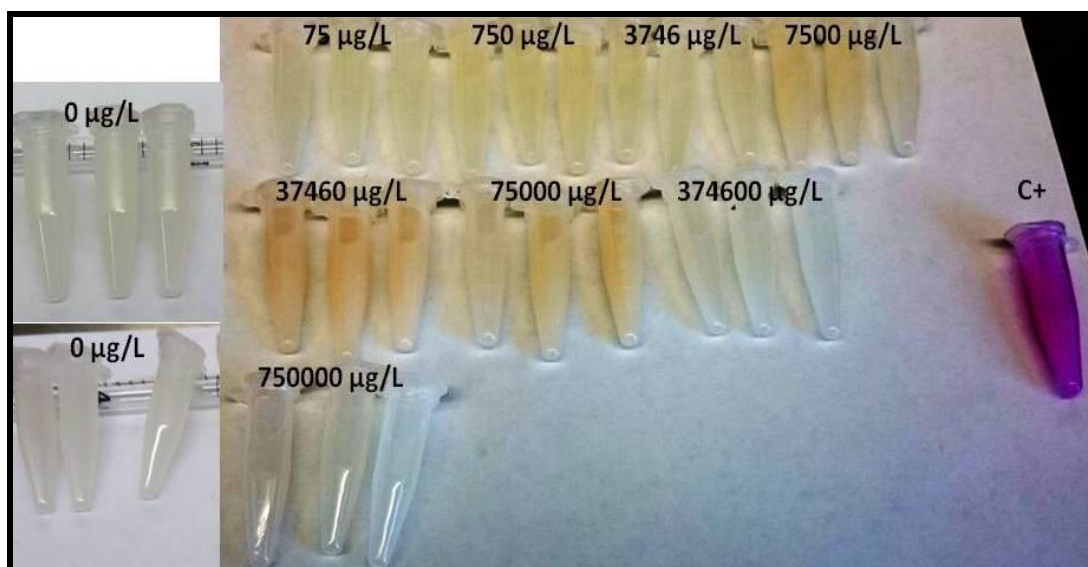


Figura 4-28. Cambio de color del biosensor BASros bajo diferentes concentraciones de As(V) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. La biomasa fue resuspendida en medio mínimo M9 para realizar las lecturas colorimétricas (ver Figura 4-29). (C+): corresponde al crecimiento y expresión del color del recombinante *E.coli*-TOP10+cromoproteína sin el gen *arsR*, o sea, expresión de la cromoproteína sin regulación génica (ver sección 4.2.1).

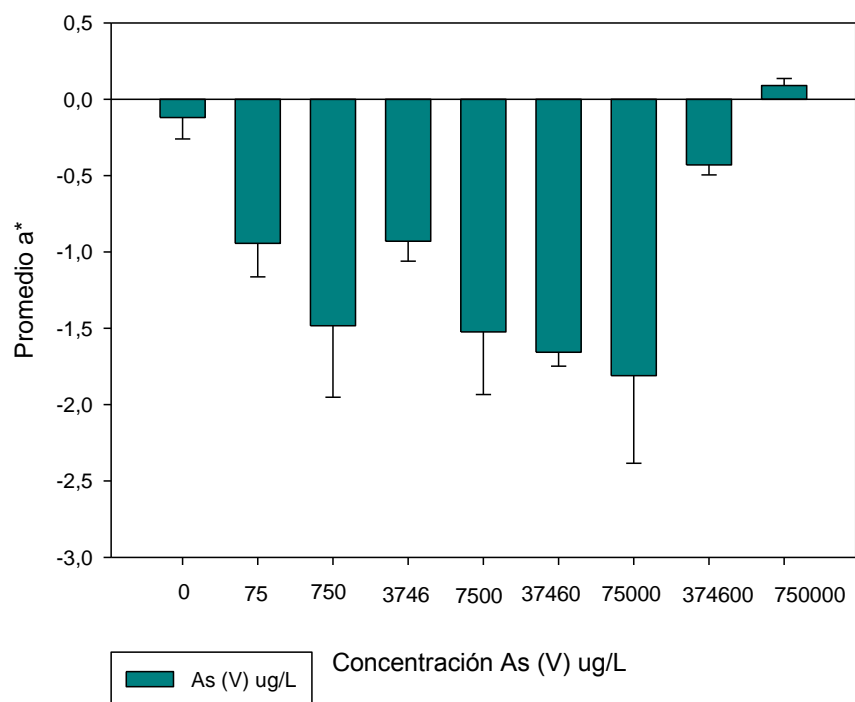


Figura 4-29. Evaluación colorimétrica del biosensor BASros en diferentes concentraciones de As(V) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. Lecturas realizadas con un colorímetro de mesa ColorQuest XE (Hunterlab).

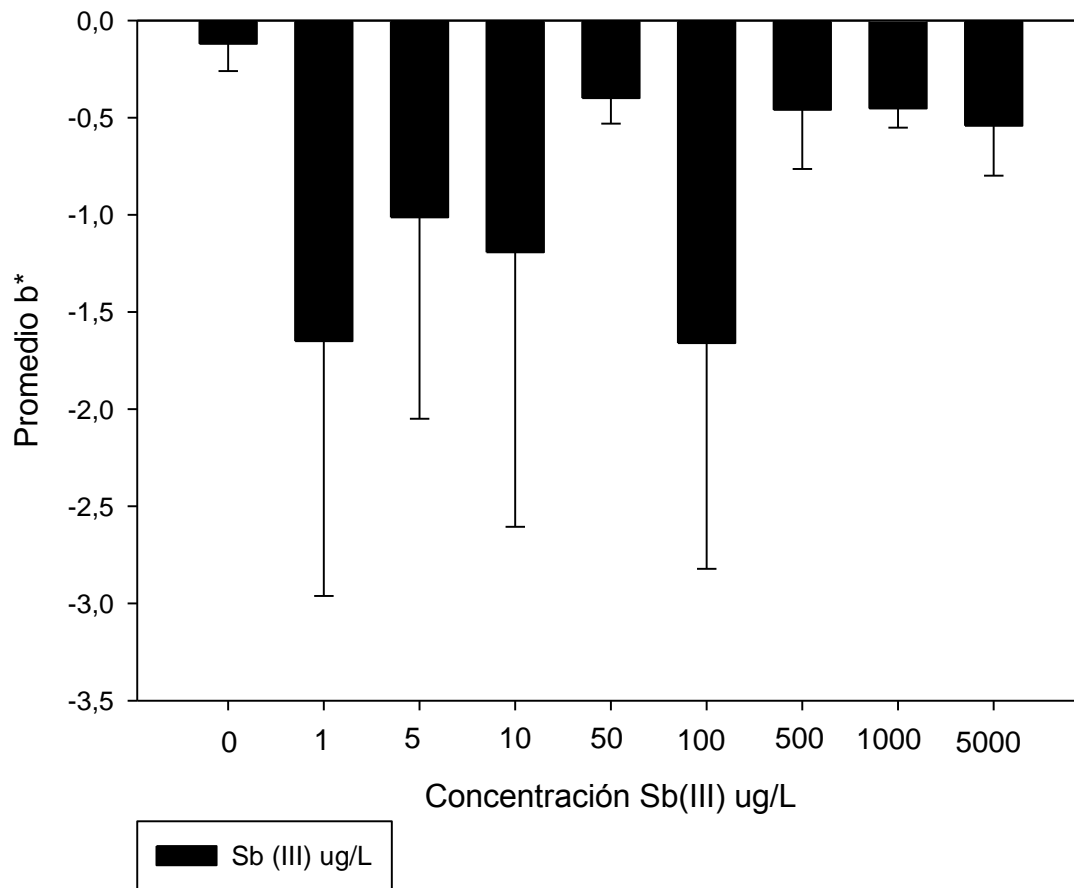


Figura 4-30. Evaluación colorimétrica del biosensor BASros en diferentes concentraciones de Sb(III) después de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad. Lecturas realizadas con un colorímetro de mesa ColorQuest XE (Hunterlab).

4.3.3 Evaluación de fluorescencia del biosensor BASama bajo diferentes concentraciones de arsenito, arsenato y antimonio

La última cromoproteína utilizada como sistema reportero fue la pSB1C3-B0034-amilGFP, la cual tiene como ventaja que es fluorescente sin necesidad de agregar ningún sustrato al medio de cultivo. Adicionalmente, al utilizar este sistema reportero se esperaba obtener un menor límite de detección comparado con los biosensores BASmor y BASros en la detección de los metaloides ya que esta técnica es más sensible y permitiría finalizar el proyecto postulando un biosensor para la detección cualitativa de As (BASmor ó BASros) y uno para la cuantificación de As en aguas (BASama).

En el biosensor BASama se evaluó el cambio de las unidades de fluorescencia (UF) en diferentes concentraciones de As(III) después de 4 h de inducción (Figura 4-31). En la Figura 4-32 se observa como a medida que aumentó la concentración de As(III) las unidades de fluorescencia aumentaron gradualmente. En el estudio realizado por Diorio *et al.* (1995) observaron un umbral de expresión del operón *ars*, determinando que la inducción del operón no era observable a concentraciones menores de 1 µg As(III)/L. Sin embargo, al comparar los resultados con los biosensores a As que han utilizado GFP como sistema reportero (Buffi *et al.*, 2011; Kawakami *et al.*, 2010; Siddiki *et al.*, 2011; Stocker *et al.*, 2003; Tani *et al.*, 2009), el límite de detección obtenido en el presente estudio (7,5 µg As(III)/L) es acorde con lo reportado (Tabla 1-1). Se sugiere realizar algunas modificaciones como la adición de una copia extra del promotor del gen *arsR* ó aumentar el tiempo de inducción como lo propone Ramanathan *et al.* (1998). Esto podría incrementar la sensibilidad del sistema ensamblado.

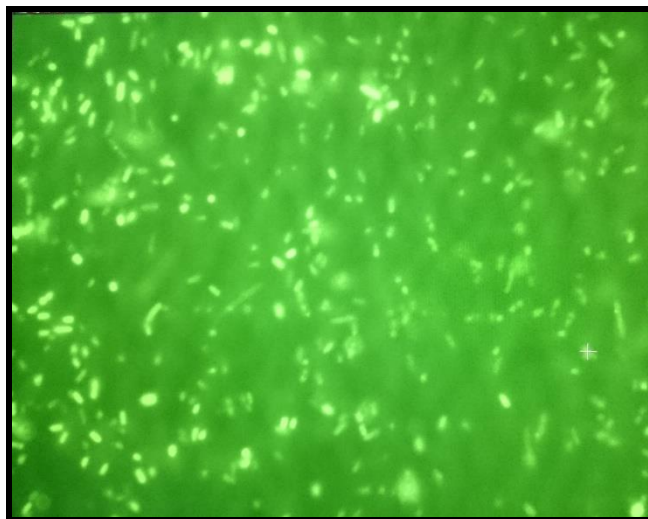


Figura 4-31. Fluorescencia emitida por el cultivo de *E.coli*-BASama en medio LBA después de 24 h de incubación a 37 °C en 7500 µg/L de As(III).

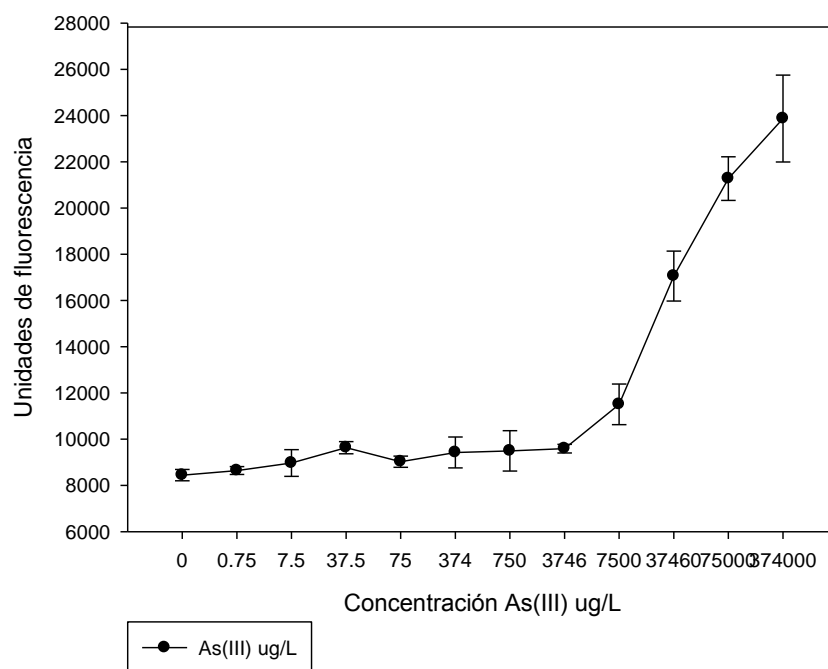


Figura 4-32 Evaluación de la fluorescencia emitida por el biosensor BASama en diferentes concentraciones de As(III) después de 4 h de inducción a 37 °C, 200 rpm y en oscuridad. Lecturas realizadas en un espectrofluorómetro con lámpara de xenón (PTI QuantaMaster 300).

Cuando se realizaron las mediciones con diferentes concentraciones de As(V) (Figura 4-33), el comportamiento del biosensor BASama no fue el esperado ya que no se obtuvo una respuesta dependiente de la concentración del metaloide presente en la muestra. Este resultado generó curiosidad ya que se esperaba obtener un comportamiento similar al obtenido con el biosensor BASmor, pero más sensible. Sin embargo, anteriormente se había realizado un ensayo modificando algunas de las condiciones mencionadas en la sección 3.5.4. Estas modificaciones fueron que el cultivo no se conservó a -80°C una vez obtenido el $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0,6 y que el montaje fue realizado en un microtubo de 1,5 ml. En este ensayo (Figura 4-34) se observó que las unidades de fluorescencia aumentaron dependiendo de la concentración de As(V) hasta un valor máximo cercano a las 12000 UF, donde después empezaron a disminuir. Este comportamiento si fue similar al obtenido con el biosensor BASmor bajo diferentes concentraciones de As(V). Lamentablemente, no fue posible comparar estos datos con los obtenidos en el ensayo del biosensor BASama con As(III) (Figura 4-32) ya que las condiciones experimentales no fueron las mismas, por lo que se sugiere que se repita este ensayo.

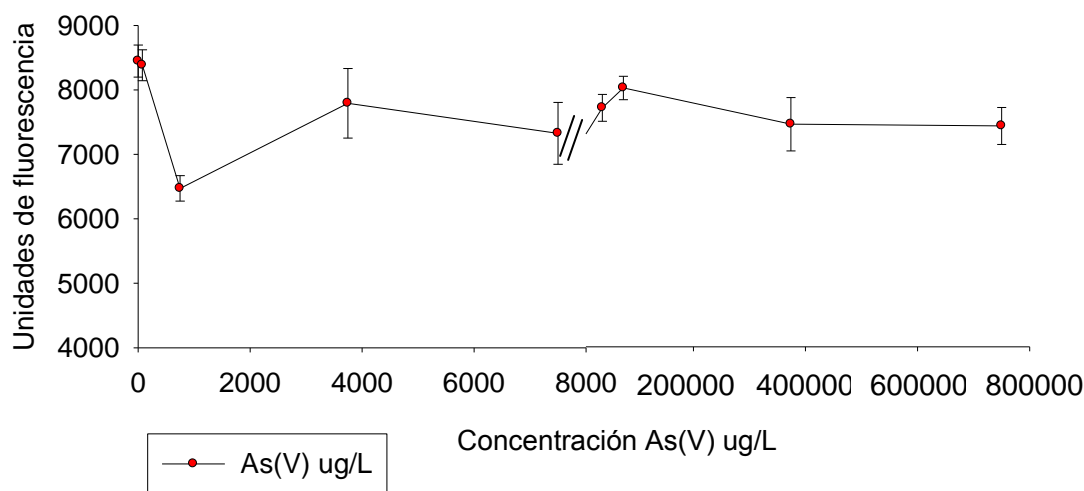


Figura 4-33 Evaluación de la fluorescencia emitida por el biosensor BASama (ensayo con células conservadas a -80°C) en diferentes concentraciones de As(V) después de 4 h de inducción a 37°C , 200 rpm y en oscuridad. Lecturas realizadas en un espectrofluorómetro con lámpara de xenón (PTI QuantaMaster 300).

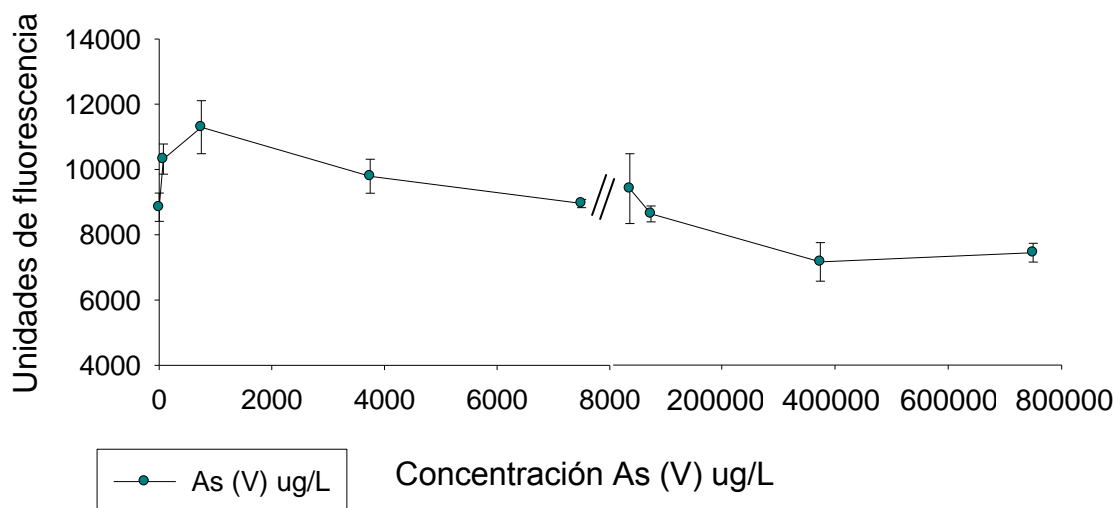


Figura 4-34. Evaluación de la fluorescencia emitida por el biosensor BASama (ensayo con células sin conservar a -80 °C) en diferentes concentraciones de As(V) después de 4 h de inducción a 37 °C, 200 rpm y en oscuridad. Lecturas realizadas en un espectrofluorómetro con lámpara de xenón (PTI QuantaMaster 300).

Al evaluar el comportamiento del biosensor BASama en diferentes concentraciones de Sb(III) (Figura 4-35), este fue muy similar al obtenido con el biosensor BASmor, en donde no se obtuvo una respuesta dependiente de las concentraciones de Sb(III) presentes en el medio. En la mayoría de los casos, la respuesta estuvo por debajo de la emitida en el punto de 0 $\mu\text{g Sb(III)/L}$. Sin embargo, en esta ocasión al llegar a la concentración de 5000 $\mu\text{g Sb(III)/L}$ se observó como las unidades de fluorescencia aumentaron hasta llegar cerca de las 12000 UF. Este comportamiento permite deducir que el sensor si reconoce los iones de Sb(III) pero que es necesaria una gran concentración de estos en el medio para producir una respuesta, situación similar a la reportada por Ivanina *et al.* (2009) en donde se requieren concentraciones mayores a 400 $\mu\text{g Sb(III)/L}$ para obtener un cambio.

Esta situación no ocurre con el biosensor BASmor debido a que la metodología empleada para evaluar las diferentes concentraciones de As y Sb presentes en el medio son distintas. En los ensayos en donde se evalúa color el cultivo microbiano debe crecer bajo las diferentes concentraciones de los metaloides por lo cual el Sb(III) inhibe el crecimiento de la célula y por lo tanto no se produce cromoproteína. En cambio, en el biosensor BASama el cultivo en fase exponencial es sometido a un choque directo con el

metaloide y el tiempo de contacto con este es relativamente corto. Por esto, la respuesta si se alcanza a observar mediante esta metodología.

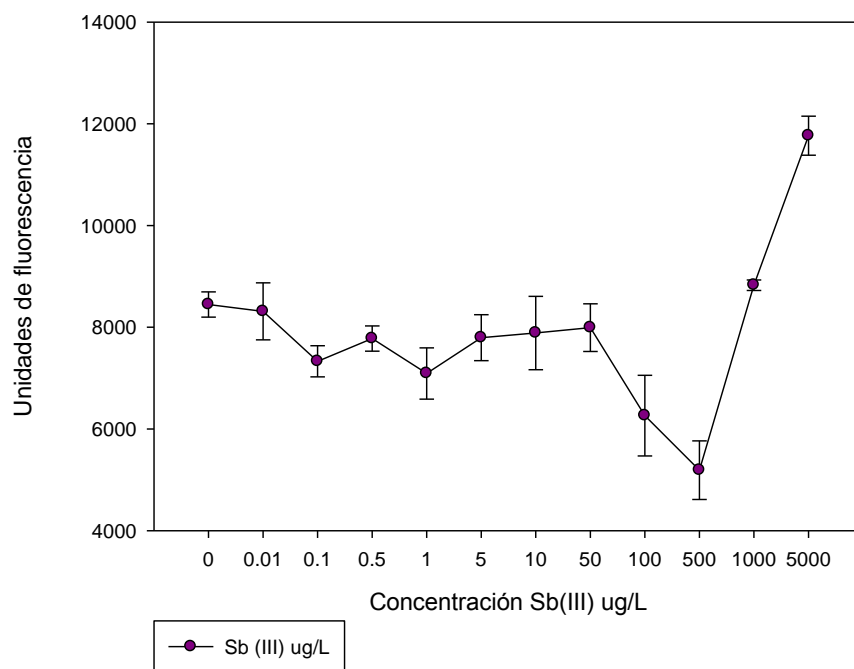


Figura 4-35 Evaluación de la fluorescencia emitida por el biosensor BASama en diferentes concentraciones de Sb(III) después de 4 h de inducción a 37 °C, 200 rpm y en oscuridad. Lecturas realizadas en un espectrofluorómetro con lámpara de xenón (PTI QuantaMaster 300).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se identificaron, de material biológico nativo de Colombia, dos secuencias correspondientes al gen *arsR* las cuales mostraron una estrecha relación para los genes *arsR* de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (identidad del 99%, $E=2e-64$) y *Escherichia coli* ST540 (identidad del 100%, $e=0.0$).
- Se ensamblaron tres biosensores para la detección de arsénico empleando el gen *arsR* obtenido de una secuencia metagenómica de la sabana de Bogotá (estrecha relación con el gen *arsR* de *E. coli*) y diferentes cromoproteínas como gen reportero en el plásmido pUC18 y utilizando la cepa *E. coli* TOP10 como célula huésped del constructo.
- Se presenta el primer reporte en el país del ensamblaje de varios biosensores para la detección de arsénico
- Se presenta el primer reporte del ensamblaje de varios biosensores para la detección de arsénico empleando cromoproteínas como sistema reportero.
- El biosensor BASmor ensamblado se perfila como una posible alternativa para determinar la ausencia/presencia de As en una muestra de agua, ya que permite realizar una evaluación cualitativa de As(III) y As(V). Sin embargo, se hace necesario realizar modificaciones al constructo con el fin de aumentar la sensibilidad de este sensor.
- El biosensor BASros no produjo resultados positivos bajo las condiciones de estudio. Por esto, se propone realizar una evaluación de las condiciones óptimas de expresión de la cromoproteína para este sistema.
- El biosensor BASama mostró un límite de detección de 7,5 µg As (III)/L, permitiendo una medición cuantitativa de este ion en solución acuosa.

5.2 Recomendaciones y Perspectivas

- Debido a que en el estudio realizado por Rosenstein *et al.* (1994) se demuestra que a pesar de que los diversos tipos de gen *arsR* cumplen la misma función en la célula, estos no tienen la misma sensibilidad. Así, y teniendo en cuenta que en este estudio se identificó el gen *arsR* correspondiente al género *Bacillus* sp., sería interesante estudiar a futuro la sensibilidad a arsenito y arsenato de este gen junto con su promotor.
- De las cromoproteínas empleadas como sistema reportero aún se desconoce sus condiciones óptimas de expresión. Por esto, es importante realizar estudios a profundidad con los biosensores desarrollados en un amplio rango de condiciones como temperatura, tiempo de incubación, sustratos, medios de cultivo y exposición a diferentes longitudes de onda, para establecer las mejores condiciones de expresión del color en cada uno de los casos (morado y rosado).
- Debido a los resultados presentados en la sección 4.3.1, en donde el color no es perceptible en cultivos líquidos, se recomienda evaluar si hay una posible interacción entre los metales y las cromoproteínas reporteras que pueda estar generando este comportamiento.
- Se recomienda realizar un estudio del tiempo óptimo de inducción de la fluorescencia en el biosensor BASama diseñado.
- Debido a los resultados obtenidos con el biosensor BASama en presencia de diferentes concentraciones de arsenato, se recomienda repetir estos ensayos sin realizar el paso de congelación de las células a -80 °C.
- De acuerdo a lo reportado por Chiou *et al.* (2011); Kawakami *et al.* (2010) y Yoshida *et al.* (2008), en donde en ocasiones el gen *arsR* junto con su promotor reconocen otros metales diferentes al As, se recomienda realizar ensayos de los biosensores en presencia de otros elementos como: hierro, calcio, zinc, cobre y cobalto.
- Se debe estudiar la posibilidad de realizar modificaciones al constructo para buscar la forma de aumentar la sensibilidad del biosensor BASmor. Una opción para esto sería colocar una copia adicional de gen *arsR*+promotor como lo realizó Stocker *et al.* (2003).

ANEXO A: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

A.1 Composición química del medio TSA y TSB

Nota: Se utilizó agua desionizada para la preparación de todos los medios de cultivo y soluciones.

TRYPTICASE SOY AGAR (TSA)

COMPONENTE	CANTIDAD POR LITRO
Triptona	15 g
Cloruro de sodio	5 g
Digerido enzimático de harina de soya	5 g
Agar-Agar	15 g

TRYPTICASE SOY BROTH (TSB)

El medio de cultivo TSB tiene la misma composición en g/L que el medio TSA a excepción del agar-agar, componente que no se debe adicionar.

A.2 Composición química del medio Luria-Bertani (LB)

COMPONENTE	CANTIDAD POR LITRO
Triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar-Agar	15 g

A.3 Antibióticos

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN EN EL MEDIO
Ampicilina	100 µg/ml
Kanamicina	50 µg/ml
Cloranfenicol	50 µg/ml
Tetraciclina	15 µg/ml

A.4 Composición química del medio SOC

COMPONENTE	CANTIDAD
Peptona de Caseína	20 g/L
Cloruro de sodio	0,58 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
KCl	0,19 g/L
MgCl ₂ + MgSO ₄	20 mM
Glucosa	20 mM

A.5 Composición química del medio mínimo M9

COMPONENTE	CANTIDAD (para 100 ml)
Sales M9 (5X)	20 ml
Glucosa (20 %)	2 ml
MgSO ₄ (1 M)	200 µl
CaCl ₂	10 µl
H ₂ O _{desionizada}	78 ml

SALES M9

COMPONENTE	CANTIDAD POR LITRO
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	64 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	5 g

A.6 Composición química del Buffer TE

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL (1X)
Tris-HCl (pH 7,4) -1 M	1 ml
EDTA (pH 8,0) – 0.5 M	0.2 ml

A.7 Composición química del CTAB/NaCl

COMPONENTE	CANTIDAD PARA 100 ml
NaCl	4,1 g
CTAB	10 g
H ₂ O _{desionizada}	100 ml

A.8 Composición química soluciones lisis alcalina (1, 2 y 3)

SOLUCIÓN ALCALINA 1.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL
Glucosa	50 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM

Nota: Esterilizar en autoclave por 15 minutos 15 psi y almacenar a 4 °C.

SOLUCIÓN ALCALINA 2.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL
NaOH	0,2 N
SDS	1 %

SOLUCIÓN ALCALINA 3.

COMPONENTE	CANTIDAD PARA 100 ml
Acetato de potasio 5M	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
H ₂ O _{desionizada}	28,5 ml

A.9 Composición química del buffer “*crush and soak*”

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL
Acetato de amonio	0,5 M
Acetato de magnesio	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	0,1 %

A.10 Composición química del buffer TBE (5x)

COMPONENTE	CANTIDAD POR LITRO
Tris base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5M (pH 8,0)	20 ml

A.11 Composición química del buffer TAE (50x)

COMPONENTE	CANTIDAD POR LITRO
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5M (pH 8,0)	100 ml

ANEXO B: PROTOCOLOS

B.1 Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico fue realizada empleando el método enzimático reportado por Andrews *et al.* (1996). En seguida se describe el protocolo usado:

Inocular cada una de las cepas de interés en 100 ml de medio TSB e incubar a 37 °C y 200 rpm durante 12 horas. Centrifugar a 855 rpm durante 15 min, descartar el sobrenadante y lavar la biomasa con solución salina (0,85 % NaCl) estéril. Repetir esta operación de lavado tres veces. Resuspender la biomasa en buffer TE (Anexo A.6) y lisozima (Sigma) e incubar a 37 °C durante 1 h. Adicionar SDS 1 % y proteinasa K (Fermentas), mantener durante 1 h a 50 °C en baño-maría. Agregar NaCl 0,85% y CTAB/NaCl (Anexo A.7) y sumergir 10 min a 65 °C en baño-maría. Agregar solución de fenol:cloroformo: alcohol isoamilico (proporción 25:24:1) (Amresco), mezclar en vórtex y centrifugar 5 min a 13.000 rpm. Transferir el sobrenadante a un microtubo estéril y agregar la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (proporción 25:24:1) (Amresco), mezclar suavemente y centrifugar 5 min a 13.000 rpm. Transferir el sobrenadante a un microtubo estéril y agregar isopropanol frío; mantener en hielo durante 2 h. Centrifugar por 10 min a 13.000 rpm, descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol frío al 70 %. Centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm, descartar el etanol y dejar evaporar los residuos. Resuspender el ADN precipitado en 100 µL de buffer TE (Anexo A.6), adicionar RNAsa (Fermentas) (15 µg/ml) e incubar a 37 °C durante 1 h. Verificar la extracción del ADN realizando una electroforesis en gel de agarosa 1 % (100 V, 60 min) utilizando marcador Hypperlader™ 1 kb® (Bioline) y tinción del gel con SYBR® Safe (Invitrogen). Cuantificar la concentración de ADN (Nanodrop 2000, ThermoScientific). El ADN se mantiene a -20 °C hasta su uso en los procedimientos posteriores.

B.2 Extracción de ADN plásmidico: Lisis alcalina

La extracción del ADN plasmídico fue realizada siguiendo el protocolo propuesto por Sambrook, (2001). A continuación se describe brevemente el protocolo utilizado:

Inocular 15 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de interés e incubar 12 h a 37 °C y 200 rpm. Centrifugar a 8.500 rpm por 15 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante y resuspender la biomasa en 200 µl solución alcalina 1 (Anexo A.8), agitar en vortex y añadir 400 µl solución alcalina 2 (Anexo A.8); agitar suavemente y agregar 300 µl de solución alcalina 3 (Anexo A.8); agitar en vortex y mantener en hielo por 3-5 minutos. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C y transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo. Añadir 600 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (proporción 25:24:1) (Amresco) y mezclar. Centrifugar a 12.000 rpm por 2 min a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo y añadir un volumen igual de isopropanol, mezclar y precipitar a temperatura ambiente durante 2 min. Centrifugar a 13.000rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 70 %, centrifugar a 13.000rpm por 2 min y descartar el sobrenadante. Dejar evaporar el etanol y resuspender el pellet en agua. Confirmar la extracción del ADN plasmídico realizando una electroforesis en gel de agarosa 1 % (100 V, 60 min) y cuantificar la concentración de ADN por nanodrop 2000 (ThermoScientific).

B.3 Preparación de células competentes de *E. coli* usando cloruro de calcio.

La preparación de células competentes utilizadas en este trabajo fue realizada siguiendo el protocolo reportado por Sambrook (2001), modificado como se indica brevemente a continuación. Las cepas de *E. coli* para las cuales se prepararon células competentes utilizando este protocolo fueron: *E. coli* TOP10, *E. coli* DH5α, *E. coli* AW3110 y *E. coli* BL21.

Día 1: A partir de un stock de glicerol de bacterias no quimiocompetentes de *E. coli* DH5α o TOP10, sembrar una alícuota en agar LB sin antibiótico, incubando durante 18 horas a 37 °C y 200 rpm.

Día 2: Elegir una colonia aislada (2-3 mm de diámetro) de las cajas de Petri con LB sin antibiótico e inocular en 3 ml de medio líquido LB sin antibiótico; incubar durante 18 horas a 37°C y 200 rpm.

Día 3: Tomar 0,5 ml del cultivo preparado en el día 2 para inocular 100 ml de medio líquido LB suplementado con 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,2 % glucosa, sin antibiótico e incubar aproximadamente 4 h a 37 °C y 200 rpm, monitoreando constantemente la densidad óptica a 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) hasta obtener un valor de 0,5-0,6. Transferir el cultivo celular a dos tubos falcon estériles de 50 ml previamente enfriados. Centrifugar 10 min a 8.500 rpm y 4 °C. Descartar el sobrenadante y resuspender la biomasa en una solución de MgCl_2 - CaCl_2 fría. Recuperar las células por centrifugación a 8.500 rpm durante 10 min a 4 °C. Remover el sobrenadante y resuspender la biomasa en 0,5 ml de medio A (LB suplementado con 10 mM MgSO_4 y glucosa 0,2 %) frío y 2,5 ml de medio B (LB suplementado con 12 mM MgSO_4 , 36 % glicerol y 12 % polietilenglicol) frío. Mezclar con vórtex y servir alícuotas de 0,1 ml en 30 crioviales debidamente marcados. Almacenar a -80°C.

B.4 Transformación de células competentes de *E. coli*

La transformación de células competentes utilizadas en este trabajo fue realizada siguiendo el protocolo reportado por Sambrook (2001), modificado como se indica brevemente a continuación:

Descongelar en frío (hielo o bloque de enfriamiento) uno de los viales de células competentes almacenados a -80°C (Anexo B.3). Transferir 50 µl de las células a un microtubo estéril de 2 ml (previamente enfriado) y añadir de 1 a 5 µl del ADN resuspendido (a una concentración aproximada de 100 ng/µl). Mezclar suavemente con la pipeta automática 6 a 10 veces. Incubar en hielo por 30 min. Realizar choque térmico de las células por inmersión del microtubo, durante 1 min, en un baño de agua precalentado a 42 °C. Incubar las células en hielo durante 5 min. Agregar 200 µl del medio SOC (Anexo A.4) a cada transformación e incubar las células a 37 °C por 2 h a 200 rpm. Tomar alícuotas de 20, 50 y 100 µl y sembrar en medio sólido LB + antibiótico. Incubar las cajas a 37 °C por 18 - 24h.

B.5 Análisis de *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP)

Para el análisis por SSCP se siguió el protocolo propuesto por Brandão *et al.* (2002). A continuación se describe brevemente el procedimiento utilizado:

El procedimiento para la realización de este ensayo se describe brevemente a continuación. Se prepararon dos vidrios para realizar el “sándwich” del gel de electroforesis para análisis de los perfiles de SSCP. El primero de ellos es el vidrio que contiene el gel (vidrio pequeño), que fue lavado con metanol, luego se le agregó una solución adherente (1 ml de una solución al 10% de ácido acético en etanol, más 3 µl de solución fijadora (3-trimetoxisilil propil metacrilato) Sigma M6514) la cual se dejó secando por 5 minutos. Finalmente, se realizaron 3 lavados con metanol. Para el vidrio repelente (vidrio grande), se realizó lo siguiente: primero se limpió con 1 ml de metanol, después se agregó 1 ml de Sigmacote (Sigma SL-2) y se distribuyó por todo el vidrio, luego se dejó secar y se pulió ambos vidrios. Inmediatamente de la preparación de ambos vidrios, se colocaron dos separadores entre el vidrio grande y pequeño, juntando todo por medio de ganchos. Posteriormente se preparó el gel MDE 0,50X para SSCP, que contiene: 12,5 ml de 2X MDE, 31,28 ml de agua Mili-Q, 6 ml de 5X TBE (Anexo A.10), 200 µl de una solución al 10 % de persulfato de amonio y 20 µl de TEMED. Esto se mezcló y se tomó con una jeringa, para ser servido entre los dos vidrios. Para la preparación de la muestra un volumen de 5 µl de los productos de PCR fueron mezclados con el buffer de carga de SSCP (formamida al 95 % v/v, NaOH 10 mM, azul de bromofenol 0,25 % y azul xileno 0,25 %), luego estas muestras se desnaturalizaron a 95 °C por 2 minutos (C1000™ Thermal cycler, BioRad), y se pasaron las muestras inmediatamente a hielo. Posteriormente, estas muestras se cargaron en cada uno de los pozos del gel. La electroforesis se llevó a cabo con 4 µl de cada muestra, en tampón de corrida TBE (Anexo A.10) 0,6X a temperatura ambiente y a 5 W constantes por 13:30 h. Luego de la electroforesis, se realizó el protocolo de tinción para la visualización del ADN. Este consistió en dejar el gel 20 minutos en ácido acético 10 %, después se lavó 3 veces con agua desionizada, seguido de un baño por 30 minutos con una solución de nitrato de plata (2 L de agua Mili-Q, 3 ml de formaldehído, 2 g nitrato de plata). Finalmente, se revelaron las bandas con una solución de carbonato de calcio (2 L de agua Mili-Q, 3 ml

de formaldehído, 60 g de carbonato de sodio y 400 µl de tiosulfato de sodio (10 mg/ml). Para fijar las bandas en el gel se realizó un baño con ácido acético por 15 minutos y se lavó 3 veces con agua desionizada. Se dejó secar el gel al aire.

B.6 Corte de Bandas SSCP: “Crush and Soak”

Este procedimiento fue utilizado para eluir el ADN de la matriz de gel de poliacrilamida con los genes de interés para posteriormente re-amplificarlo por PCR con el fin de identificar la secuencia de ADN de una banda específica del perfil electroforético. Las moléculas de ADN fueron eluidas del gel siguiendo el protocolo “crush and soak” propuesto por Dohrmann *et al.* (2004), descrito brevemente en seguida:

Usando una cuchilla estéril cortar cuidadosamente la banda de interés del gel de poliacrilamida. Transferir la banda cortada a un microtubo de 1,5 ml y añadir 50 µl del buffer “crush and soak” (Anexo A.9). Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente dividir la pieza de gel en varios pedazos con la ayuda de una punta para micropipeta e incubar a 37 °C durante 3 h a 800 rpm. Transferir 40 µl del líquido sobrenadante a un microtubo de 1,5 ml y añadir 80 µl de etanol frío. Invertir suavemente el microtubo varias veces y dejar precipitando el ADN toda la noche a -20 °C. Centrifugar el microtubo a 12.500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Remover el sobrenadante y dejar el pellet durante 10 min. Resuspender el ADN en 12 µl de agua ultrapura (Mili-Q) y medir la concentración de ADN utilizando Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Para amplificar el ADN de las bandas, se añadieron 2 µl de la solución de ADN a una reacción de 50 µl de volumen final de PCR.

B.7 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

El procedimiento utilizado para la digestión enzimática de cada una de las partes empleadas para el ensamblaje del biosensor fue el descrito por el protocolo del Biobrick assembly kit® (New England Biolabs Inc), modificado como descrito en seguida:

Parte a digerir (ej., pUC18, <i>arsR</i> , cromoproteína)	Concentración final: 300 ng/μl
Enzima 1 (20.000 U/ml)	0,25 μl
Enzima 2 (20.000 U/ml)	0,25 μl
Buffer NE 10X 2.1	2,5 μl
H ₂ O _{desionizada}	Completar volumen a 25 μl

*Las enzimas empleadas en cada reacción variaron de acuerdo a la parte a digerir: gen *arsR*, *EcoRI*-HF y *SpeI*; cromoproteína, *XbaI* y *PstI*; y pUC18, *EcoRI*-HF y *PstI*.

Posteriormente se incubaron las reacciones a 37 °C durante 40 minutos y luego se inactivaron las enzimas a 80 °C durante 20 minutos.

B.8 LIGACIÓN

El procedimiento utilizado para la ligación de las partes empleadas para el ensamblaje del biosensor fue el descrito por el protocolo del Biobrick assembly kit®(New England Biolabs Inc), modificado como descrito en seguida:

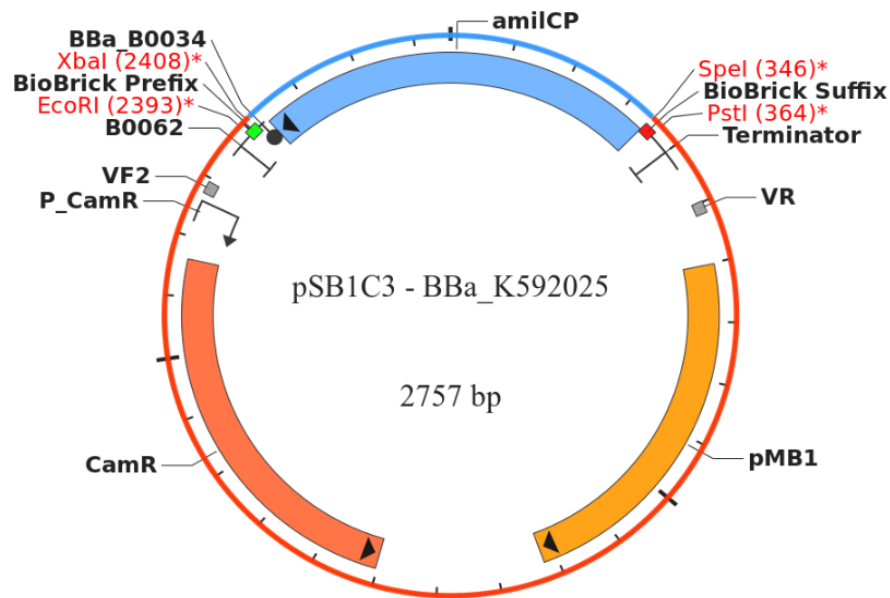
Gen o Reactivo	Volumen a adicionar en la reacción
Partes a ligar	Varía de acuerdo a la reacción de ligación deseada
10X Buffer ADN Ligasa T4	2 μl
ADN Ligasa T4	1 μl
H ₂ O _{desionizada}	Completar volumen a 20 μl

Programa de ligación:

Temperatura	Tiempo(h:min:seg)
16 °C	1:30:00
21 °C	0:30:00
22 °C	0:45:00
23 °C	0:30:00
80 °C	0:20:00

ANEXO C: PLÁSMIDOS

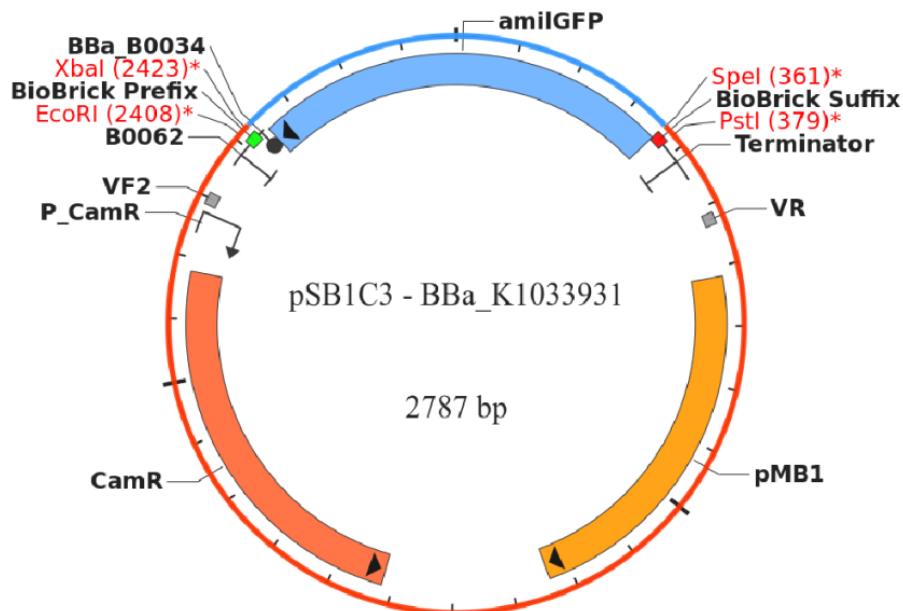
C.1 Mapa y secuencia genética del plásmido de cromoproteína pSB1C3-B0034-amilCP (Morada)



>BBa_K592025 Part-only sequence (687 bp)

```
Aaagaggagaaataactagatgagtgatcgctaacaacaaatgacctacaaggtttatatgtcaggcacgggtc
aatggacactactttgaggtcgaaggcgatggaaaaggtaagccctacgagggggagcagacggtaaagctc
actgtcaccaagggcgacactctgccatttgcttgggatattttatcaccacagtgtcagtacggaagcata
ccattcaccaagtagacctgaagacatccctgactatgtaaagcagtcattcccgagggtatatacatgggag
aggatcatgaactttgaagatgggtgcagtggtgtactgtcagcaatgattccagcatccaaggcaactgtttc
atctaccatgtcaagttctctggtttgaactttctcccaatggacctgtcatgcagaagaagacacagggc
tggaacccaacactgagcgtctctttgcacgagatggaatgctgctaggaacaactttatggctctgaag
ttagaaggaggcggtcactatttgtgtgaatttaaaactacttacaaggcaaagaagcctgtgaagatgcca
gggtatcactatgttgaccgcaaactggatgtaaccaatcacaacaaggattacacttcggttgagcagtggt
gaaatttccattgcacgcaaactgtggtcgccctaataa
```

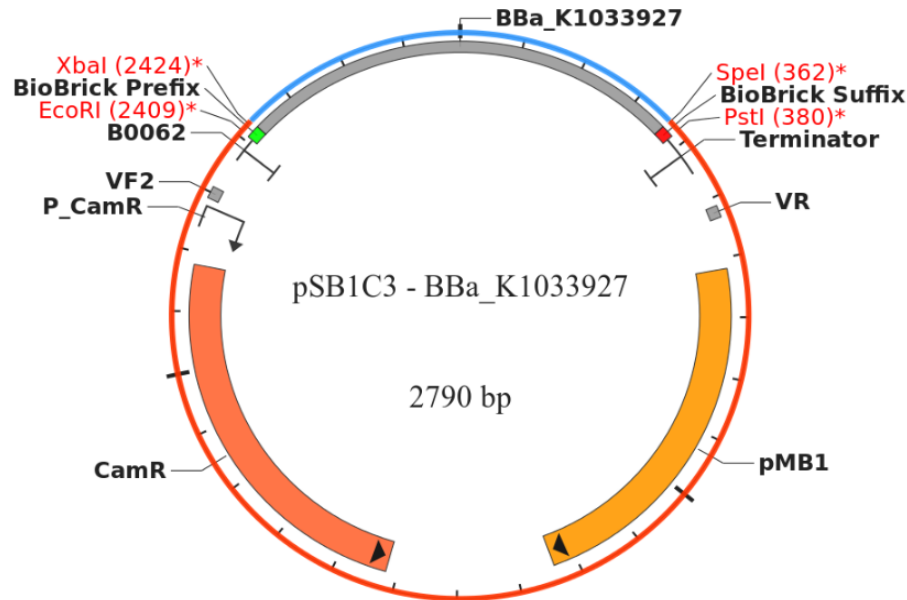
C.2 Mapa y secuencia genética del plásmido de cromoproteína pSB1C3-B0034-amilGFP (Amarilla)



>BBa_K1033931 Part-only sequence (717 bp)

```
Aaagaggagaaatactagatgtcttattcaaagcatggcatcgtacaagaaatgaagacgaaataccatattg
gaaggcagtggtcaatggccatgaattttacgatcgaagggtgttaggaactgggtacccttacgaagggaacag
atgtccgaattagtgatcatcaagcctgcgggaaaaccccttcattctcctttgacatactgtcatcagtc
tttcaatatggaaaccggttgcttcacaaagtacccggcagacatgcctgactatttcaagcaagcattccca
gatggaatgtcatatgaaaggtcatttctatttgaggatggagcagttgctacagccagctggaacattcgt
ctcgaaggaaattgcttcatccacaaatccatctttcatggcgtaaactttcccgctgatggaccgtaatg
aaaaagaagacaattgactgggataagtccttcgaaaaaatgactgtgtctaaagagggtgctaagagggtgac
gtgactatgtttcttatgtctcgaaggaggtggttctcacagatgccaatttcaactccacttacaaaacagag
aagccggtcacactgccccgaatcatgtcgtagaacatcaaattgtgaggaccgaccttggccaaagtgca
aaaggctttacagtcaagctggaagcacatgccgcgggtcatgttaaccctttgaagggttaataataa
```

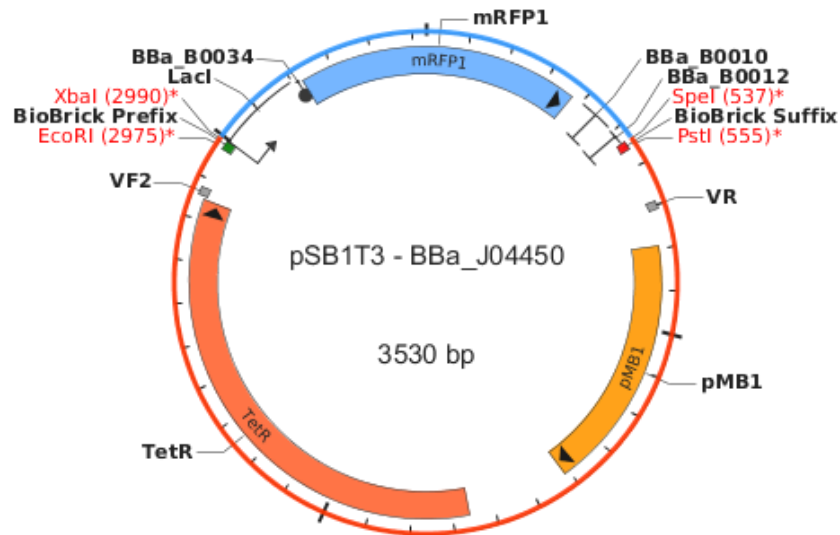
C.3 Mapa y secuencia genética del plásmido de cromoproteína pSB1C3-B0034-asPink (Rosada)



>BBa_K1033927 Part-only sequence (720 bp)

```
Aaagaggagaaataactagatggcgagcttctgaaaaagacgatgccggttcaaaaccacgattgaaggcacg
gtcaacgggtcactacttttaaatgtacgggttaaaggcgaaggtaaccggttcgaaggcaccaggaaatgaaa
attgaagtcacatgaaggcgggtccgctgccgtttgcgtttcatattctgagcacgtcttgcattgtacgggtca
aagaccttcatcaagtacgtgtcgggtatcccggtattacttttaaacagagcttcccggaaggcctttacctgg
gaacgtaccacgacctatgaagatggcgggtttcctgacggcgccaccaagacacctctctggatgggtgactgt
ctgggtgtacaaagttaagattctgggcaacaattttccggccgatgggtccgggttatgcagaacaaagcgggc
cgttgggaaccgggtacggaaatcgtctatgaagtggacggcggttctgcgcgggtcaatccctgatggccctg
aaatgcccgggcggtcgtcatctgacctgtcatctgcacacgacctatcgtagcaaaaaaccggcgagcgcc
ctgaaaatgccgggctttcatttcgaagatcacgcattgaaatcatggaagaagtcgaaaaaggtaagtgc
tacaagcagtacgaagcagcagtggggtcgctattgtgatgcccaccgagcaagctgggtcataattaataa
```

C.4 Mapa y secuencia genética del plásmido de resistencia a Tetracilina pSB1T3- BBa_J044450

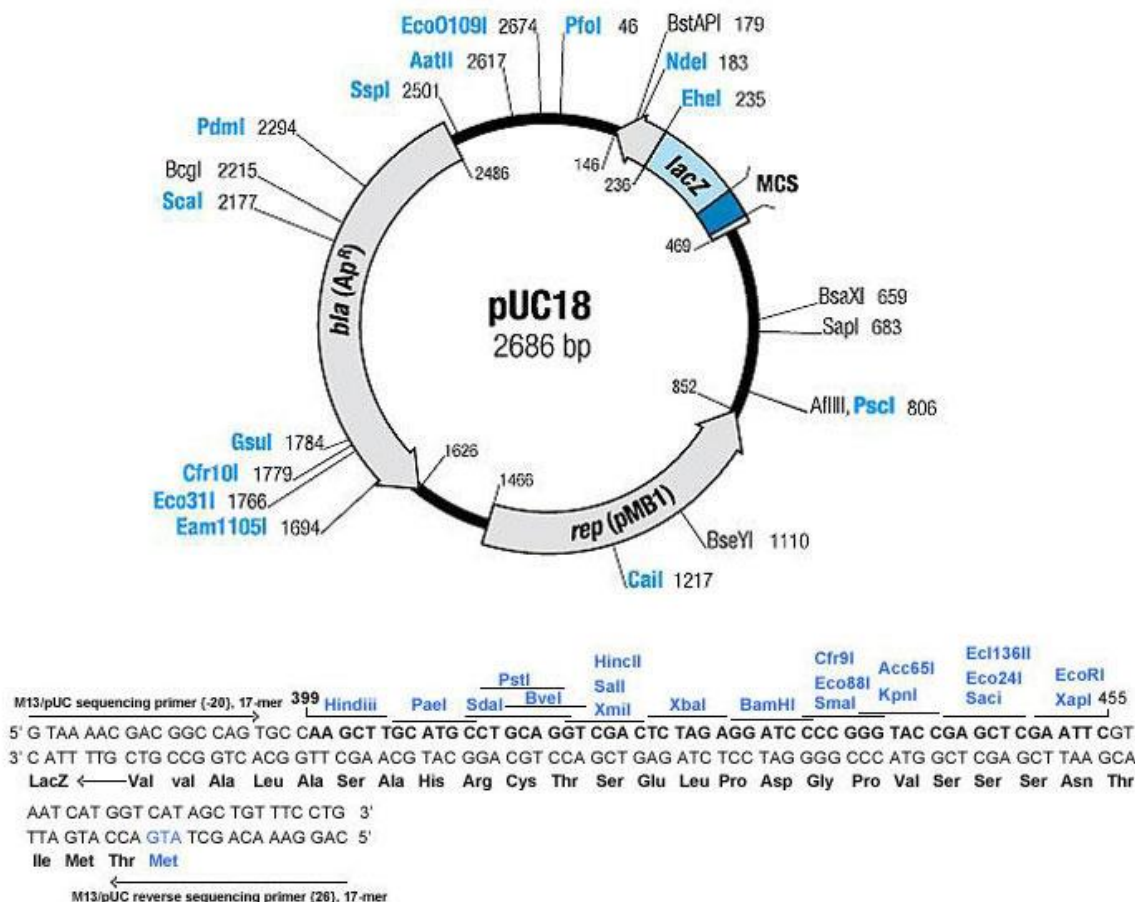


>pSB1T3 Part-only sequence (2461 bp)

```
tactagtagcggccgctgcagtcggaacaaaagggaaggtgtcaccaccctgccctttttcttt
aaaaccgaaaagattacttcgcgttatgcaggttccctcgtcactgactcgtcgcctcggtcgt
tcggctgcgccgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcagggga
taacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgtt
gctggcggtttttccacaggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagag
gtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggtttccccctggaagctccctcgtcgcctc
tctgttccgaccctgccgcttacccgatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgct
ttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcggttcgctccaagctgggctgtgt
gcacgaacccccggttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgctcttgagtccaacc
ggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgt
aggcggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttgg
tatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaca
aaccaccgctggtagcgggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatc
tcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagg
gattttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaatataaaatgaagttt
taaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagctcgagattctcatgtttgacagc
ttatcatcgataagctttaatgcggtagtttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcaccgt
gtatgaaatctaacaatgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcaccctggatgctgtaggcatag
gcttggttatgccggtactgccgggctcttgcgggatatacgtccattccgacagcatcgccagtc
actatggcgtgctgctagcgtatatgcgttgatgcaatttctatgcgcacccggttctcggagcac
tgtccgaccgctttggccgcgcgcagtcctgctcgcttcgctacttgagccactatcgactacg
cgatcatggcgaccacaccgctcctgtggatcctctacgcggacgcacgtggccggcatcaccg
gcgccacaggtgcggttgcgtggcgcttatatcgccgacatcaccgatggggaagatcgggctcgcc
acttcgggctcatgagcgcttgtttcggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgggggactgt
tgggcgccatctccttgcatgcaccattccttgcggcggcggtgctcaacggcctcaacctactac
tgggctgcttcctaataatgcaggagtcgcataaggagagcgtcgaccgatgcccttgagagccttca
```

accagtcagctccttccggtgggcgcggggcatgactatcgtcgccgcacttatgactgtcttct
ttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgaggaccgcttct
gctggagcgcgacgatgatcggcctgtcgcttgcggtattcggaatcttgcacgccctcgctcaag
ccttcgtcactgggtcccgccaccaaacgtttcggcgagaagcaggccattatcgccggcatggcgg
ccgacgcgctgggctacgtcttgctggcggttcgcgacgcgaggctggatggccttccccattatga
ttcttctcgcttccggcggcacatcgggatgcccgcggttcgagggccatgctgtccaggcaggtagatg
acgaccatcagggacagcttcaaggatcgctcgcggtcttaccagcctaacttcgatcactggac
cgctgatcgtcacggcgatttatgccgcctcggcgagcacatggaacgggttgcatggattgtag
gcgcgcctataccttgtctgcctcccccggttcgctcgcggtgcatggagccgggccacctga
cctaactcgagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaatag
gcgtatcacgaggcagaatttcagataaaaaaaatccttagctttcgctaaggatgatttctggaa
ttcgcgcccgcttctagag

C.5 Mapa y secuencia genética del vector pUC18

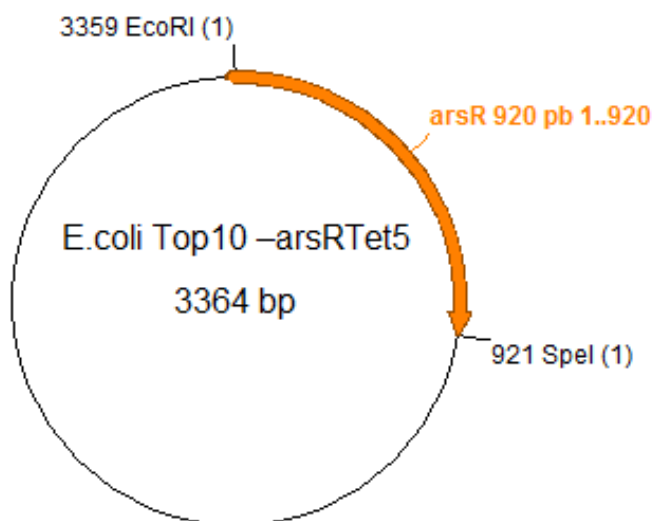


>pUC18_2686pb

```
tcgcgcgttttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagctt
gtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgttgccgggtgtc
ggggctggcttaactatgcccgcacagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaa
taccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcacatcaggcgccattcgccattcagggtgcgcaact
gttggaaggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctg
caaggcgattaagtgtggtaacgccagggttttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtg
ccaagcttgcatgcctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcgtaatca
tggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagagccgga
agcataaagtgtaaagcctggggtgcctaattgagtgcgtaactcacattaattgcgttgcgctca
ctgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaaacgcgcgggg
agaggcgggtttgcgtattgggcgctcttcgcttccctcgctcactgactcgctgcgctcggtcggt
cggtgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggttaatacgggttatccacagaatcaggggat
aacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttg
ctggcggtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagagg
tggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggtttccccctggaagctccctcgctgcgctct
cctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctt
```

tctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtg
cacgaaccccccggttcagcccgaccgctgcgccttatccggttaactatcgctcttgagtccaacccg
gtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcagaggtatgta
ggcgggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggt
atctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaaca
accaccgctggtagcgggtgggttttttggtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatct
caagaagatcctttgatcttttctacgggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaaggg
attttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaatataaaatgaagttt
aaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggctctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggca
cctatctcagcgatctgtctatcttcgttcacatcatagttgcctgactccccgctgctgtagataact
acgatacgggaggggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccg
gctccagattttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggctcctgcaact
ttatccgcctccatccagtcctattaattggttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaat
agtttgcgcaacggttggtgccattgctacaggcatcggtggtgtcacgctcgctcgtttggtatggct
tcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttggtgcaaaaaagcg
gttagctccttcgggtcctccgatcggtgtcagaagtaagttggccgcagtggttatcactcatgggt
atggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgag
tactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgccggcggtcaata
cgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcgggg
cgaaaactctcaaggatcttaccgctggttgagatccagttcgatgtaaccactcggtgcacccaac
tgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgcc
gcaaaaaaggggaataagggcgacacggaaatggtgaatactcatactcttcctttttcaatattat
tgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaa
caaatagggggttcgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatc
atgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgaggcccttttcgtc

C.6 Mapa y secuencia genética del recombinante *E. coli* TOP10-arsRTet5



>E.coli top 10-arsRTet5_3364pb

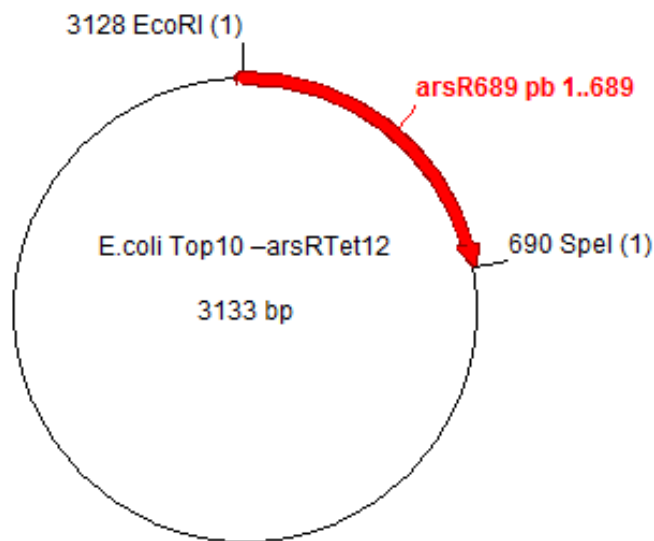
```

accactcagggctggaaagtaaaaaaccgacgcaaggtcgggttttttacatccggattcggaca
aggcttaatatgacgatgaccagtgaaagtatataaatcgtcactgcgatatataccgaagtgc
ccctccgccagctgaagaaatcgctaattcttgcaatgttagccactggctaatagtattgagctg
ttagataagaactctctcactccagccagagccaccaactcagggctggaaagtaaaaaaccgacg
caaagtcgggtttttttacgtcctgattcagacctcctttcaaatagaatagccaactcaaaattcac
acctattaccttccctctgcacttacacattcggttaagtcatatatgtttttgacttatccgcttcg
aagagagacactacctgcaacaatcagaagcgcaatatgtcatttctgttacccatccaattgttc
aaaattcttgctgatgaaaccgctctgggcacgtgtttactgctcagcgaactgggagagttatgc
gtctgcgatctctgcactgctctcgaccagtcgcagcccaagatctcccgccacctggcattgctg
cgtgaaagcgggctattgctggaccgcaagcaaggtaagtgggttcattaccgcttatcaccgcat
attccagcatgggcggcgaaaattattgatgaggcctggcgatgtgaacaggaaaaggttcaggcg
attgtccgcaacctggctcgacaaaactgttcggggacagtaagaacatttgagttaaaaattt
agctaaacacatatgaattttcagatgtgttttatccgggaggcattatgttactggcaggcgcta
tctttgtcctgaccatcgatttggttatctggcagccgaaagggttaggcacggtgagtagta
gtagcgggcgctgcagtcgggcaaaaaagggcaagggtgtcaccaccctgccctttttctttaa
cgaaaagattacttcgcgttatgcaggttctctcgctcactgactcgctgcgctcggtcggttcggc
tgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggttaatacgggttatccacagaatcaggggataacg
caggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctgg
cgtttttccacaggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtgcaggggtggc
gaaaccgcagaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgctgcgtctcctg
ttccgacctgcccgttacgggataacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctc
atagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcggttcgctccaagctgggctgtgtgcacg
aaccctccggttcagcccgcagcgtgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtcacacccggtaa
gacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcg
gtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatct

```

gcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaccca
ccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaag
aagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaaacgaaaactcacgttaagggattt
tggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaat
caatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagctcgagattctcatgtttgacagcttatc
atcgataagctttaatgcggtagtttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcaccgtgtatg
aaatctaacaatgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcaccctggatgctgtaggcataggcttg
gttatgccggtactgccgggcctccttgccgggatatcgctccattccgacagcatcgccagtcactat
ggcgtgctgctagcgctatatgcgttgatgcaatttctatgcgcacccgttctcggagcactgtcc
gaccgctttggccgcccagtcctgctcgttcgctacttgagccactatcgactacgcgatc
atggcgaccacacccgtcctgtggatcctctacgccggacgcacatcgtggccggcatcaccggcgcc
acaggtgcggttgctggcgccatatcgccgacatcaccgatggggaagatcgggctcgccacttc
gggctcatgagcgcttggttcggcggtgggtatggtggcaggcccccgtggccgggggactgttgggc
gccatctccttgcatgcaccattccttgccggcggtgctcaacggcctcaacctactactgggc
tgcttcctaatagcaggagtcgcataagggagagcgctcgaccgatgcccttgagagccttcaaccca
gtcagctccttcgggtggcgcggggcatgactatcgctcgccgacttatgactgtcttctttatc
atgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgaggaccgctttcgctgg
agcgcgacgatgatcggcctgtcgttgcggtattcggaatcttgacgcctcgtcgaagccttc
gtcactggtcccgccaccaaacgtttcggcgagaagcaggccattatcgccggcatggcgggccgac
gcgctgggctacgtcttgctggcggttcgcgacgcgaggctggatggccttccccattatgattctt
ctcgttccggcgggcatcgggatgcccggttgccaggccatgctgtccaggcaggtagatgacgac
catcagggacagcttcaaggatcgctcgcggtcttaccagcctaacttcgatcactggaccgctg
atcgtcacggcgatttatgccgcctcggcgagcacatggaacgggttgcatggattgtaggcgcc
gccctataccttgctgctcctcccggttgctcgcggtgcatggagccggggccacctcgacctaa
ctcgagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgta
tcacgaggcagaatttcagataaaaaaaatccttagctttcgctaaggatgatttctggaattc

C.7 Mapa y secuencia genética del recombinante *E. coli* TOP10-arsRTet12



>E.coli top 10-arsrtet12_3133pb

```

accactcagggtggaagtaaaaaaccgacgcaaagtcgggttttttacgtcctgattcagacc
tcctttcaaataagcaactcaaaattcacacattaccttctctgcacttacacattcgt
taagtcataatggttttgacttatccgcttcgaagagagacactacctgcaacaatcaggagcgc
aatatgtcatttctgttaccatccaattgttcaaaattcttgctgatgaaaccgctctgggcac
gttttactgctcagcgaactgggagagttatgcgtctgcgatctctgcactgctctcgaccagtcg
cagcccaagatctcccgccacctggcattgctgcgtgaaagcgggctattgctggaccgcaagcaa
ggtaagtgggttcattaccgcttatcaccgcataattccagcatgggcggcgaaaattattgatgag
gcctggcgatgtgaacaggaaaagggttcaggcgattgtccgcaacctggctcgacaaaactgttcc
ggggacagtaagaacatttgcagttaaaaatttagctaaacacatatgaattttcagatgtgtttt
atccgggaggcattatgttactggcaggcgctatctttgtcctgaccatcgtatttggttatctggc
agccgaaagggttttaggcacggttgagtactagtagcgccgctgcagtcgggcaaaaaagggca
agggtgcaccaccctgccctttttctttaaaaccgaaaagattacttcgcgttatgcaggcttcct
cgctcactgactcgctgcgctcggtcggttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcgg
taatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaa
aggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgctggcggtttttccacaggctccgccccctgacgagc
atcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgcagaggactataaagataaccaggcgt
ttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgcccgttaccggataacctgtccg
cctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtg
aggctgcttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccggttcagcccgaaccgctgcgccttat
ccggttaactatcgtcttgagtccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactg
gtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaact
acggctacactagaagaacagtatatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaa
gagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcggtgggttttttgtttgcaagc
agcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacgggggtctgacg
ctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacct

```

agatcctttttaaatataaaatgaagtttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctg
acagctcgagattctcatgtttgacagcttatcatcgataagctttaatgcggtagtttatcacag
ttaaattgctaacgcagtcaggcacctgtgtatgaaatctaacaatgcgctcatcgctcatcctcggc
accgtcaccttggtatgctgtaggcataggcttggttatgccggtactgccgggcctcttgcgggat
atcgctccattccgacagcatcgccagtcactatggcgtgctgctagcgctatatgcgttgatgcaa
tttctatgcgcacccgttctcgaggactgtccgaccgctttggcgcgcgcagtcctgctcgct
tcgctacttgagccactatcgactacgcgatcatggcgaccacaccgctcctgtggatcctctac
gccggacgcacgcgtggccggcatcacccggcgccacaggtgcggttgctggcgccatatcgccgac
atcacgatggggaagatcgggctcgccacttcgggctcatgagcgcttgtttcggcggtgggtatg
gtggcaggccccgtggccgggggactgttgggcgccatctccttgcatgcaccattccttgcggcg
gcggtgctcaacggcctcaacctactactgggctgcttcctaatagcaggagtcgcataagggagag
cgtcgaccgatgcccttgagagccttcaaccagtcagctccttcgggtgggcgcggggcatgact
atcgtcgccgcacttatgactgtcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctc
tgggtcattttcggcgaggaccgcttctgctggagcgcgacgatgatcggcctgtcgcttgcggt
ttcggaatcttgacgccttcgctcaagccttcgctcactggtcccgcaccaaacgtttcggcgag
aagcaggccattatcgccggcatggcgccgacgcgctgggctacgtcttgctggcgcttcgcgacg
cgaggctggatggccttccccattatgattcttctcgcttcggcgggcatcgggatgcccgcggtg
caggccatgctgtccaggcaggtagatgacgacctcaggacagcttcaaggatcgctcgcggt
cttaccagcctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcacggcgatttatgccgcctcggcgagc
acatggaacgggttgcatggattgtaggcgccgcctataccttgctgcctccccgcggttgct
cgcggtgcatggagccgggcccacctcgacctaaactcgagtgccacctgacgtctaagaaaccatta
ttatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggcagaatttcagataaaaaaaatcct
tagctttcgctaaggatgatttctggaattc

C.8 Secuencia genética del biosensor BASmor

>BASmor_ 4282pb

```
gacgaaagggcctcgtgatacgcctatTTTTTataggttaatgtcatgataataatggTTTTcttaga
cgtcaggtggcactTTTTcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatTTTTtctaaatacatt
caaatatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaaga
gtatgagtatccaacatttccgtgtcgcccttattccctTTTTtgcggcattttgccttccctgttt
ttgctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggggtt
acatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaa
tgatgagcactTTTTaaagtcttgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagc
aactcggtcgcccatacactattctcagaatgacttgggttgagtactcaccagtcacagaaaagc
atcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtcgccataacctgagtgataaacactg
cggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctTTTTtgacaacatgg
gggatcatgtaactcgcttgatcggttggaacccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagc
gtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacggttgcgcaaactattaactggcgaactactta
ctctagcttccccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgc
gctcggcccttccggctgggtgtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcg
gtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgggga
gtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcatt
ggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaattta
aaaggatctaggtgaagatcctTTTTgataatctcatgacccaaaatcccttaacgtgagtttctgt
tccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctTTTTtctgcgcg
taatctgctgcttgcaaaaaaaaaccacgcgtaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagc
taccaactctTTTTccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctag
tgtagccgtagtttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaa
tctgttaccagtggtgctgcccagtgggcgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagacgat
agttaccggataaggcgcagcgggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgggagc
gaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaa
ggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttc
cagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttccgccacctctgacttgagcgtcgat
TTTTgtgatgctcgtcaggggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctTTTTtacgg
tccctggcctTTTTgctggcctTTTTgctcacatgttcttccctgcgttatccctgattctgtggata
accgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcaggt
cagtgagcggaggaagcgggaagagcgcccaatacgcgaacccgcctctccccgcgcgttggccgattc
attaatgcagctggcagcagaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatg
tgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttggtgtg
gaattgtgagcggataacaatttccacacaggaaacagctatgaccatgattacgaattcaccaact
cagggctggaaagtaaaaaaccgacgcgaaggtcgggtTTTTtacatccggattcggacaaggctta
atatgacgatgaccagtgaaagtataaaatcgtcactgcgatataaccgaagtgtcctcccg
ccagctgaagaaatcgctaattcttgcaatgttagccactggctaatagtattgagctgttagata
agaactctctcactccagccagagccaccaactcagggctggaaagtaaaaaaccgacgcaaagtc
ggTTTTTTTTacgtcctgattcagacctcctttcaaatgaatagccaactcaaaattcacacctatt
accttctctgcacttacacattcgttaagtcatatatgtTTTTgacttatccgcttcgaagagag
acactacctgcaacaatcagaagcgcaatatgtcatttctgttaccatccaattgttcaaaattc
ttgctgatgaaacccgctctgggcatcgTTTTactgctcagcgaactgggagagttatgctgtcgcg
atctctgcactgctctcgaccagtcgcagcccaagatctcccgccacctggcattgctgcgtgaaa
gcgggctattgctggaccgcaagcaaggttaagtgggttcattaccgcttatcaccgcatattccag
catgggcgggcgaaaattattgatgaggcctggcgatgtgaacaggaaaaggttcaggcgattgtcc
gcaacctggctcgacaaaactgttccgggggacagtaagaacatttgagttaaaaatttagctaaa
cacatatgaattttcagatgtgttttatccgggaggcattatgttactggcaggcgcgtatctttgt
```

cctgaccatcgtattggttatctggcagccgaaagggttaggcatcggctggagtactagagaaag
aggagaaatactagatgagtgtgatcgctaaacaaatgacctacaagggtttatatgtcaggcacgg
tcaatggacactactttgaggtcgaaggcgatggaaaaggtaagccctacgagggggagcagacgg
taaagctcactgtcaccaaggggcgacctctgccatttgcttgggatattttatcaccacagtgtc
agtacggaagcataccattcaccaagtagccctgaagacatccctgactatgtaaagcagtcattcc
cggagggctatacatgggagaggatcatgaactttgaagatgggtgcagtgtgtactgtcagcaatg
attccagcatccaaggcaactgtttcatctaccatgtcaagttctctgggttgaactttcctccca
atggacctgtcatgcagaagaagacacagggtgggaacccaacactgagcgtctctttgcacgag
atggaatgctgctaggaacaactttatggctctgaagttagaaggaggcggtcactatttgtgtg
aatttaaaactacttacaaggcaaagaagcctgtgaagatgccagggtatcactatgttgaccgca
aactggatgtaaccaatcacaacaaggattacacttcggttgagcagtgtgaaatttccattgcac
gcaaacctgtggtcgcctaataatactagtagcgccgctgcaggcatgcaagcttggcactggcc
gtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcgttacccaacttaatcgcccttgcagcacat
ccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgccacgatcgcccttcccaacagttgcgc
agcctgaatggcgaatggcgccctgatgcggtattttctccttacgcacatctgtgcggtatttcacac
cgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgatagttaagccagccccgacacccg
ccaacacccgctgacgcgcctgacgggcttgtctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtg
accgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcga

C.9 Secuencia genética del biosensor BASros

>BASros_ 4315pb

```
gacgaaagggcctcgtgatacgcctatTTTTTataggttaatgtcatgataataatggTTTTcttaga
cgtcaggtggcactTTTTcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatTTTTtctaaatacatt
caaatatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaaga
gtatgagtatccaacatttccgtgtcgcccttattccctTTTTtgcggcattttgccttcctgttt
ttgctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtt
acatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgTTTTccaa
tgatgagcactTTTTaaagtcttgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagc
aactcggtcgcccatacactattctcagaatgacttgggttgagtactcaccagtcacagaaaagc
atcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtcgccataacctgagtgataaacactg
cggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgTTTTtgacaacatgg
gggatcatgtaactcgcttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagc
gtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactactta
ctctagcttccccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgc
gctcggcccttccggctgggtgtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcg
gtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagtattctacacgacgggga
gtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcatt
ggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaattta
aaaggatctaggtgaagatcctTTTTgataatctcatgacccaaaatcccttaacgtgagtttctgt
tccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctTTTTtctgcgcg
taatctgctgcttgcaaaaaaaaaccacgcgtaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagc
taccaactctTTTTccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctag
tgtagccgtagtttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaa
tctgttaccagtggtgctgcccagtgggcgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagacgat
agttaccggataaggcgcagcgggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgggagc
gaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaa
ggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttc
cagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttccgccacctctgacttgagcgtcgat
TTTTgtgatgctcgtcaggggggcgagccctatggaaaaacgccagcaacgcggcctTTTTtacgg
tccctggcctTTTTgctggcctTTTTgctcacatgttcttccctgcgttatccctgattctgtggata
accgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcaggt
cagtgagcggaggaagcgggaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattc
attaatgcagctggcagcaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatg
tgagttagctcactcattaggaaccccgaggtttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtg
gaattgtgagcggataacaatttccacacaggaaacagctatgacctgattacgaattcaccaact
cagggctggaaagtaaaaaaccgacgcaaggtcggTTTTTTacatccggattcggacaaggctta
atatgacgatgaccagtgaaagtataaaatcgtcactgcgatataaccgaagtgtcctcccg
ccagctgaagaaatcgctaattcttgcaatgttagccactggctaatagtattgagctgttagata
agaactctctcactccagccagagccaccaactcagggctggaaagtaaaaaaccgacgcaaagtc
ggTTTTTTTTacgtcctgattcagacctcctttcaaatgaatagccaactcaaaattcacacctatt
accttctctgcacttacacattcgttaagtcatatatgtTTTTgacttatccgcttcgaagagag
acactacctgcaacaatcagaagcgcaatatgtcatttctgttaccatccaattgttcaaaattc
ttgctgatgaaacccgtctgggcatcgTTTTactgctcagcgaactgggagagttatgctgtcgcg
atctctgcactgctctcgaccagtcgcagcccaagatctcccgccacctggcattgctgcgtgaaa
gcgggctattgctggaccgcaagcaaggttaagtgggttcattaccgcttatcaccgcatattccag
catgggcgggcgaaaattattgatgaggcctggcgatgtgaacaggaaaaggttcaggcgattgtcc
gcaacctggctcgacaaaactgttccgggggacagtaagaacatttgagttaaaaatttagctaaa
cacatatgaattttcagatgtgttttatccgggaggcattatgttactggcaggcgctatcttctgt
```

cctgaccatcgtattggttatctggcagccgaaaggtttagggcatcggctggagtactagagaaag
aggagaaatactagatggcgagcttcctgaaaaagacgatgccgttcaaaaccacgattgaaggca
cgggtcaacggtcactactttaaatgtacgggtaaaggcgaaggtaaccggttcgaaggcaccagc
aatgaaaattgaagtcacgaaggcgggtccgctgccgtttgcgtttcatattctgagcacgtctt
gcatgtacgggtcaaagaccttcatcaagtacgtgtcgggtatcccggttactttaaacagagct
tcccggaaggctttacctgggaacgtaccacgacctatgaagatggcggtttcctgacggcgacc
aagacacctctctggatggtgactgtctggtgtacaaagttaagattctgggcaacaattttccgg
ccgatggtccggttatgcagaacaaagcgggcccgttgggaaccggctacggaaatcgtctatgaag
tggacggcggttctgcgcgggtcaatccctgatggccctgaaatgccggggcggtcgtcatctgacct
gtcatctgcacacgacctatcgtagcaaaaaaccggcgagcgccctgaaatgccgggctttcatt
tcgaagatcacgcattgaaatcatggaagaagtcgaaaaaggtaagtgtacaagcagtacgaag
cagcagtgggtcgctattgtgatgcggcaccgagcaagctgggtcataattaataatactagtagc
ggccgctgcaggcatgcaagcttggcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccct
ggcggtacccaacttaatcgcccttgacgacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagag
gcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgccctgatgcgggtat
tttctccttacgcatctgtgcgggtatttcacaccgcatatgggtgcactctcagtacaatctgctct
gatgccgcatagttaagccagccccgacaccgcgaacaccgcgtgacgcgccctgacgggcttgt
ctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggtt
tcaccgtcatcacccgaaacgcgcga

C.10 Secuencia genética del biosensor BASama

>BASama_4312pb

```
gacgaaagggcctcgtgatacgcctatTTTTTataggttaatgtcatgataataatggTTTTcttaga
cgtcaggtggcactTTTTcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatTTTTtctaaatacatt
caaataatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaaga
gtatgagtatccaacatttccgtgtcgcccttattccctTTTTtgcggcattttgccttccctgttt
ttgctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtt
acatcgaactggatctcaacagcggtgaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgTTTTccaa
tgatgagcactTTTTaaagtcttgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagc
aactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgggttgagtactcaccagtcacagaaaagc
atcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtcgcataacctgagtgataaacactg
cggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgTTTTtgcacaacatgg
gggatcatgtaactcgcttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagc
gtgacaccacgatgcctgttagcaatggcaacaacggttgcgcaaactattaactggcgaactactta
ctctagcttccccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgc
gctcggcccttccggctgggtgtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcg
gtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagtattctacacgacgggga
gtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcatt
ggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaattta
aaaggatctaggtgaagatcctTTTTgataatctcatgacccaaaatcccttaacgtgagtttctgt
tccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctTTTTtctgcgcg
taatctgctgcttgcaaaaaaaaaccacgcgtaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagc
taccaactctTTTTccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctag
tgtagccgtagtttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaa
tctgttaccagtggtgctgcccagtgggcgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagacgat
agttaccggataaggcgcagcgggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgggagc
gaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaa
ggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttc
cagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttccgccacctctgacttgagcgtcgat
TTTTgtgatgctcgtcaggggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctTTTTtacgg
tccctggcctTTTTgctggcctTTTTgctcacatgttcttccctgcgttatccctgattctgtggata
accgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcaggt
cagtgagcggaggaagcgggaagagcgcccaatacgcgaacccgcctctccccgcgcgttggccgattc
attaatgcagctggcagcaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatg
tgagttagctcactcattaggaaccccgaggtttacactttatgcttccggctcgtatgttggtg
gaattgtgagcggataacaatttccacacaggaaacagctatgacctgattacgaattcaccaact
cagggctggaaagtaaaaaaccgacgcaaggtcggTTTTTTacatccggattcggacaaggctta
atatgacgatgaccagtgaaagtataaaatcgtcactgcgatataaccgaagtgtccctccg
ccagctgaagaaatcgctaattcttgcaatgttagccactggctaatagtattgagctgttagata
agaactctctcactccagccagagccaccaactcagggctggaaagtaaaaaaccgacgcaaagtc
ggTTTTTTTTacgtcctgattcagacctcctttcaaatgaatagccaactcaaaattcacacctatt
accttctctgcacttacacattcgtaagtcatatatgtTTTTgacttatccgcttcgaagagag
acactacctgcaacaatcagaagcgcaatatgtcatttctgttaccatccaattgttcaaaattc
ttgctgatgaaacccgctctgggcatcgTTTTactgctcagcgaactgggagagttatgctgctgcg
atctctgcactgctctcgaccagtcgcagcccaagatctcccgccacctggcattgctgcgtgaaa
gcgggctattgctggaccgcaagcaaggttaagtgggttcattaccgcttatcaccgcatattccag
catgggcgggcgaaaattattgatgaggcctggcgatgtgaacaggaaaaggttcaggcgattgtcc
gcaacctggctcgacaaaactgttccgggggacagtaagaacatttgagttaaaaatttagctaaa
cacatatgaattttcagatgtgttttatccgggaggcattatgttactggcaggcgctatctttgt
```

cctgaccatcgtattggttatctggcagccgaaagggttaggcacggtgagtagagaaag
aggagaaatactagatgtcttattcaaagcatggcatcgtacaagaaatgaagacgaaataccata
tggaaggcagtggtcaatggccatgaatttacgatcgaagggtgtaggaactgggtacccttacgaag
ggaaacagatgtccgaattagtgatcatcaagcctgcgggaaaaccccttccattctcctttgaca
tactgtcatcagtccttcaatatggaaaccggttgcttcacaaagtaccggcagacatgcctgact
atttcaagcaagcattcccagatggaatgtcatatgaaaggtcatttctatttgaggatggagcag
ttgctacagccagctggaacattcgtctcgaaggaaattgcttcacacaaatccatctttcatg
gcgtaaactttcccgtgatggaccgtaatgaaaaagaagacaattgactgggataagtccttcg
aaaaaatgactgtgtctaaagagggtgctaagagggtgacgtgactatgtttcttatgctcgaaggag
gtggttctcacagatgccaatttccactccacttacaaaacagagaagccggtcacactgccccga
atcatgtcgtagaacatcaaattgtgaggaccgaccttgccaaagtgcaaaaggctttacagtca
agctggaagcacatgccgcggctcatgttaaccctttgaagggttaaataataactagtagcggc
cgctgcaggcatgcaagcttggcactggcgcgtggtttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggc
gttaccacaacttaatcgccttgccagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaaggcc
cgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgccagcctgaatggcgatggcgctgatgcggtat
ctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcataatggtgactctcagtacaatctgctctgat
gccgcatagtttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgcctgacgggcttgtctg
ctcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggtttca
ccgtcatcaccgaaacgcgcga

ANEXO D: PARTICIPACIÓN EN EVENTO CIENTÍFICO – MODALIDAD ORAL

A continuación se presentan el resumen de la comunicación oral del trabajo y certificado de asistencia en el XXI Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4º Congreso de Microbiología – ALAM2104, realizado del 5 al 8 de Noviembre 2014 en Cartagena de Indias, Colombia.

TLO-8. Diseño de biosensor para detectar arsénico utilizando cromoproteínas como sistema reportero

Diana Paola Tamayo F., Sergio Mauricio Latorre O.*,
Pedro Filipe Brito B.**

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia.

Introducción. El arsénico es un metaloide causante de hiperqueratosis y diferentes tipos de cáncer. La organización mundial de la salud recomienda un límite máximo de 10 µg as/L en agua potable. Los métodos para la detección del elemento son costosos, demorados y difíciles de implementar, por lo que el diseño de biosensores es una solución pues son sistemas económicos, sensibles, portátiles y de fácil manejo. En Colombia aún es escasa y reciente la información sobre el potencial riesgo de contaminación por as, siendo reportada su presencia principalmente en los departamentos de Caldas, Nariño y Tolima. El trabajo reporta el diseño de un biosensor para la detección de as en aguas utilizando cromoproteínas como sistema reportero.

Materiales y métodos. Se diseñaron 11 pares de primers con el fin de amplificar y posteriormente secuenciar regiones codificantes del gen regulador ARSR presentes en cepas nativas resistentes a arsénico y en clones provenientes de un estudio metagenómico de muestras ambientales de Colombia. Un set de cromoproteínas de distintos colores están siendo implementadas a manera de gen reportero, lo que permite la fácil y rápida visualización sin necesidad de adicionar sustratos al medio de cultivo. El ensamblaje del biosensor se está realizando utilizando el vector de clonación puc19 y el kit de clonación biobrick assembly kit utilizando *E. coli* DH5α como célula hospedera.

Resultados. El gen ARSR fue identificado en las cepas nativas resistentes a arsénico y en los clones provenientes del estudio metagenómico. Las secuencias obtenidas mostraron una estrecha relación con los genes ARSR de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (identidad del 99%, e=2e-64) y *Escherichia coli* st540 (identidad del 100%, e=0.0). Se presentarán los avances del constructo del gen ARSR con las cromoproteínas reporteras.

Conclusiones. Se pretende que el biosensor sea implementado para monitorear as en aguas potables, ampliando la información sobre la presencia del metaloide en el país.



XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología

CERTIFICAN QUE

Sra. Diana Paola Tamayo Figueroa ¹, M.Sc. Sergio Mauricio Latorre Ochoa , Ph.D. Pedro Filipe Brito Brandão

PARTICIPARON CON EL TRABAJO TITULADO:

DISEÑO DE BIOSENSOR PARA DETECTAR ARSÉNICO UTILIZANDO CROMOPROTEÍNAS COMO SISTEMA REPORTERO DIANA P. TAMAYO F., SERGIO M. LATORRE O., PEDRO F. B. BRANDÃO

EN CATEGORÍA ORAL

HOWARD JUNCA
Presidente

Asociación Colombiana de Microbiología y
Asociación Latinoamericana de Microbiología

Cartagena, Colombia
Noviembre 5 al 8 de 2014

LILIANA MARCELA OCHOA GALEANO
Directora
Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquia

BIBLIOGRAFÍA

- ATSDR, 2007. Toxicological profile for arsenic. *Department of Health and Human Services, Public Health Service*.
- EPA, 2004. *Monitoring Arsenic in the Environment: A Review of Science and Technologies for Field Measurements and Sensors*. Washington, DC
- INGEOMINAS, 2004. Programa de Exploración de Aguas subterráneas.
- ISO, 2006. *2846-1 The power of colour*.
- WHO, 2011. *Arsenic in Drinking-water* World Health Organization.
- Achour, A. R., Bauda, P., & Billard, P. (2007). Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria: Comparative Study
- Aleksic, J., Bizzari, F., Cai, Y., Davidson, B., Mora, K. d., Ivakhno, S., Millar, A. (2007). Development of a Novel Biosensor for the Detection of Arsenic in Drinking Water. *IET Synthetic Biology*, 1(Article), 87-90. doi: 10.1049/iet-stb:20060002
- Alieva, N. O., Konzen, K. A., Field, S. F., Meleshkevitch, E. A., Hunt, M. E., Beltran-Ramirez, V., Matz, M. V. (2008). Diversity and Evolution of Coral Fluorescent Proteins. *PLoS ONE*, 3(7), e2680. doi: 10.1371/journal.pone.0002680
- Alonso, D. C. (2014). *Determinación de arsénico total y biodisponible en la zona sur occidental del distrito minero de oro California-Vetas en el Departamento de Santander, Colombia*. Magister en Ciencias- Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Alonso, D. L., Latorre, S., Castillo, E., & Brandao, P. F. (2014). Environmental occurrence of arsenic in Colombia: a review. [Research Support, Review. *Environ Pollut*, 186, 272-281. doi: 10.1016/j.envpol.2013.12.009
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389-3402.
- Amsterdam, A., Lin, S., Moss, L. G., & Hopkins, N. (1996). Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Gene*, 173(1 Spec No), 99-103.
- Andrews, K. T., & Patel, B. K. C. (1996). *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a New Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from Nonvolcanically Heated Geothermal Waters of the Great Artesian Basin of Australia. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 265-269. doi: 10.1099/00207713-46-1-265
- Arber, W. (2014). Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. [Article]. *Life (2075-1729)*, 4(2), 217-224. doi: 10.3390/life4020217
- Arkin, A. (2008). Setting the standard in synthetic biology. [10.1038/nbt0708-771]. *Nat Biotech*, 26(7), 771-774.
- Bakhrat, A., Eltzov, E., Finkelstein, Y., Marks, R., & Raveh, D. (2011). UV and arsenate toxicity: a specific and sensitive yeast bioluminescence assay. *Cell Biology and Toxicology*, 27(3), 227-236. doi: 10.1007/s10565-011-9184-8
- Brandão, P. F. B., Torimura, M., Kurane, R., & Bull, A. T. (2002). Dereplication for biotechnology screening: PyMS analysis and PCR-RFLP-SSCP (PRS) profiling of 16S rRNA genes of marine and terrestrial actinomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58(1), 77-83.
- Buffi, N., Merulla, D., Beutier, J., Barbaud, F., Beggah, S., van Lintel, H., Roelof van der Meer, J. (2011). Development of a microfluidics biosensor for agarose-bead

- immobilized *Escherichia coli* bioreporter cells for arsenite detection in aqueous samples. *Lab on a Chip*, 11(14), 2369-2377. doi: 10.1039/c1lc20274j
- Bundschuh, J., Litter, M. I., Parvez, F., Roman-Ross, G., Nicolli, H. B., Jean, J. S., Toujaguez, R. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *Sci Total Environ*, 429, 2-35. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.06.024
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A., & Giedroc, D. P. (2003). The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 27(2-3), 131-143. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00054-8
- Cai, J., & DuBow, M. (1997). Use of a luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA). *Biodegradation*, 8(2), 105-111. doi: 10.1023/a:1008281028594
- Cai, J., Salmon, K., & DuBow, M. S. (1998). A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 144(10), 2705-2729. doi: 10.1099/00221287-144-10-2705
- Callejas. (2007). *Detección de arsénico de origen natural en el agua subterránea en Colombia*. Universidad de los Andes, Universidad de los Andes.
- Cánovas, D., Cases, I., & de Lorenzo, V. (2003). Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. [Article]. *Environmental Microbiology*, 5(12), 1242-1256. doi: 10.1111/j.1462-2920.2003.00463.x
- Carlin, A., Shi, W., Dey, S., & Rosen, B. P. (1995). The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J Bacteriol*, 177(4), 981-986.
- Carrillo, K. C. (2012). *Identificación de genes involucrados en la transformación y resistencia a arsénico en microorganismos recuperados de zonas de Colombia con la presencia del metal*. Universidad Nacional de Colombia.
- Casadaban, M. J., Chou, J., & Cohen, S. N. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active beta-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J Bacteriol*, 143(2), 971-980.
- Castillo, J., Gáspár, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Csöregi, E. (2004). Biosensors for life quality: Design, development and applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102(2), 179-194. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.084
- Consortium, T. U. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*, 43(D1), D204-D212. doi: 10.1093/nar/gku989
- Cortés-Salazar, F., Beggah, S., van der Meer, J. R., & Girault, H. H. (2013). Electrochemical As(III) whole-cell based biochip sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 47(0), 237-242. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.011
- Chang, Y. Y., Kuo, T. C., Hsu, C. H., Hou, D. R., Kao, Y. H., & Huang, R. N. (2012). Characterization of the role of protein-cysteine residues in the binding with sodium arsenite. *Arch Toxicol*, 86(6), 911-922. doi: 10.1007/s00204-012-0828-0
- Checa, S. K., Zurbriggen, M. D., & Soncini, F. C. (2012). Bacterial signaling systems as platforms for rational design of new generations of biosensors. *Curr Opin Biotechnol*, 23(5), 766-772. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.05.003
- Chen, J., & Rosen, B. P. (2014). Biosensors for inorganic and organic arsenicals. [Review]. *Biosensors (Basel)*, 4(4), 494-512. doi: 10.3390/bios4040494

- Chiou, C.-H., Chien, L.-J., Chou, T.-C., Lin, J.-L., & Tseng, J. T. (2011). Rapid whole-cell sensing chip for low-level arsenite detection. *Biosens Bioelectron*, 26(5), 2484-2488. doi: 10.1016/j.bios.2010.10.037
- D'souza, S. (1989). Immobilized cells: Techniques and applications. *Indian Journal of Microbiology*, 29(2), 83-117.
- D'Souza, S. F. (2001). Microbial biosensors. [Review]. *Biosens Bioelectron*, 16(6), 337-353.
- Date, A., Pasini, P., & Daunert, S. (2007). Construction of spores for portable bacterial whole-cell biosensing systems. [Report]. *Anal Chem*(24), 9391.
- Date, A., Pasini, P., & Daunert, S. (2010). Integration of spore-based genetically engineered whole-cell sensing systems into portable centrifugal microfluidic platforms. *Anal Bioanal Chem*, 398(1), 349-356. doi: 10.1007/s00216-010-3930-2
- Date, A., Pasini, P., Sangal, A., & Daunert, S. (2010). Packaging sensing cells in spores for long-term preservation of sensors: A tool for biomedical and environmental analysis. *Anal Chem*, 82(14), 6098-6103.
- Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J. S., Shetty, R. S., Shrestha, S., & Smith-Spencer, W. (2000). Genetically Engineered Whole-Cell Sensing Systems: Coupling Biological Recognition with Reporter Genes. *Chemical Reviews*, 100(7), 2705-2738. doi: 10.1021/cr990115p
- de Mora, K., Joshi, N., Balint, B. L., Ward, F. B., Elfick, A., & French, C. E. (2011). A pH-based biosensor for detection of arsenic in drinking water. *Anal Bioanal Chem*, 400(4), 1031-1039. doi: 10.1007/s00216-011-4815-8
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., & Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 7(2), 725-737.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R., & DeLuca, M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(23), 7870-7873.
- Dhuldhaj, U. P., Yadav, I. C., Singh, S., & Sharma, N. K. (2013). Microbial interactions in the arsenic cycle: adoptive strategies and applications in environmental management. [Review]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 224, 1-38. doi: 10.1007/978-1-4614-5882-1_1
- Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., & DuBow, M. S. (1995). An *Escherichia coli* chromosomal ars operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 177(8), 2050-2056.
- Dohrmann, A., & Tebbe, C. (2004). Section 3 update: Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. Akkermans & J. D. van Elsas (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual* (pp. 2711-2740): Springer Netherlands.
- Dong, S., & Chen, X. (2002). Some new aspects in biosensors. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82(4), 303-323. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1389-0352\(01\)00048-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1389-0352(01)00048-4)
- Duker, A. A., Carranza, E. J., & Hale, M. (2005). Arsenic geochemistry and health. [Review]. *Environ Int*, 31(5), 631-641. doi: 10.1016/j.envint.2004.10.020
- Esparza, C. d. (2006). *The presence of arsenic in drinking water in Latin America and its effect on public health*. Mexico
- Fabricant, J. D., Chalmers, J. H., Jr., & Bradbury, M. W. (1995). Bioluminescent strains of *E. coli* for the assay of biocides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(1), 90-95. doi: 10.1007/bf00196274

- Fujimoto, H., Wakabayashi, M., Yamashiro, H., Maeda, I., Isoda, K., Kondoh, M., . . . Yagi, K. (2006). Whole-cell arsenite biosensor using photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(2), 332-338. doi: 10.1007/s00253-006-0483-6
- Fuku, X., Iftikar, F., Hess, E., Iwuoha, E., & Baker, P. (2012). Cytochrome c biosensor for determination of trace levels of cyanide and arsenic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 730(0), 49-59. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.025>
- Gao, C., Yu, X.-Y., Xiong, S.-Q., Liu, J.-H., & Huang, X.-J. (2013). Electrochemical Detection of Arsenic(III) Completely Free from Noble Metal: Fe₃O₄ Microspheres-Room Temperature Ionic Liquid Composite Showing Better Performance than Gold. *Anal Chem*, 85(5), 2673-2680. doi: 10.1021/ac303143x
- Ghim, C. M., Lee, S. K., Takayama, S., & Mitchell, R. J. (2010). The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB Rep*, 43(7), 451-460.
- Gihring, T. M., & Banfield, J. F. (2001). Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiology Letters*, 204(2), 335-340.
- Gurskaya, N. G., Fradkov, A. F., Tersikh, A., Matz, M. V., Labas, Y. A., Martynov, V. I., Lukyanov, S. A. (2001). GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins1. *FEBS Letters*, 507(1), 16-20. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02930-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02930-1)
- Han, F., Su, Y., Monts, D., Plodinec, M. J., Banin, A., & Triplett, G. (2003). Assessment of global industrial-age anthropogenic arsenic contamination. *Naturwissenschaften*, 90(9), 395-401. doi: 10.1007/s00114-003-0451-2
- Hanson, G. T., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R. A., Tsien, R. Y., & Remington, S. J. (2004). Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13044-13053. doi: 10.1074/jbc.M312846200
- Heim, R., Cubitt, A. B., & Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature*, 373(6516), 663-664. doi: 10.1038/373663b0
- Heim, R., Prasher, D. C., & Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12501-12504.
- Heitzer, A., Webb, O. F., Thonnard, J. E., & Sayler, G. S. (1992). Specific and Quantitative Assessment of Naphthalene and Salicylate Bioavailability by Using a Bioluminescent Catabolic Reporter Bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 58(6), 1839-1846.
- Ho-Shing, O., Lau, K., Vernon, W., Eckdahl, T., & Campbell, A. M. (2012). Assembly of Standardized DNA Parts Using BioBrick Ends in *E. coli*. In J. Peccoud (Ed.), *Gene Synthesis* (Vol. 852, pp. 61-76): Humana Press.
- Hou, Q.-H., Ma, A.-Z., Lv, D., Bai, Z.-H., Zhuang, X.-L., & Zhuang, G.-Q. (2014). The impacts of different long-term fertilization regimes on the bioavailability of arsenic in soil: integrating chemical approach with *Escherichia coli* arsRp::luc-based biosensor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(13), 6137-6146. doi: 10.1007/s00253-014-5656-0
- Hu, Q., Li, L., Wang, Y., Zhao, W., Qi, H., & Zhuang, G. (2010). Construction of WCB-11: a novel phiYFP arsenic-resistant whole-cell biosensor. *J Environ Sci (China)*, 22(9), 1469-1474.

- Huang, H.-H., Camsund, D., Lindblad, P., & Heidorn, T. (2010). Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Res*, 38(8), 2577-2593. doi: 10.1093/nar/gkq164
- Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. [Review]. *Toxicol Lett*, 133(1), 1-16.
- Hughes, M. F., Beck, B. D., Chen, Y., Lewis, A. S., & Thomas, D. J. (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. [Historical Article Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, N.I.H., Intramural]. *Toxicol Sci*, 123(2), 305-332. doi: 10.1093/toxsci/kfr184
- iGEM, U. T. (2012). *Chromoproteins*. iGEM. Retrieved from http://2012.igem.org/Team:Uppsala_University/Chromoproteins
- Inskeep, W. P., Macur, R. E., Hamamura, N., Warelów, T. P., Ward, S. A., & Santini, J. M. (2007). Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental Microbiology*, 9(4), 934-943. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01215.x
- Ivanina, A. V., & Shuvaeva, O. V. (2009). Use of a bacterial biosensor system for determining arsenic in natural waters. *Journal of Analytical Chemistry*, 64(3), 310-315. doi: 10.1134/s1061934809030186
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., . . . Kyrpides, N. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423(6935), 87-91. doi: http://www.nature.com/nature/journal/v423/n6935/supinfo/nature01582_S1.html
- Ji, G., & Silver, S. (1992). Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), 9474-9478.
- Joshi, N., Wang, X., Montgomery, L., Elfick, A., & French, C. E. (2009). Novel Approaches to Biosensors for Detection of Arsenic in Drinking Water. *Desalination*, 248(Article), 517-523.
- Kaur, H., Kumar, R., Babu, J. N., & Mittal, S. (2015). Advances in arsenic biosensor development – A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*, 63(0), 533-545. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.003>
- Kaur, P., & Rosen, B. P. (1992). Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony. *Plasmid*, 27(1), 29-40.
- Kawakami, Y., Siddiki, M. S. R., Inoue, K., Otabayashi, H., Yoshida, K., Ueda, S., Maeda, I. (2010). Application of fluorescent protein-tagged trans factors and immobilized cis elements to monitoring of toxic metals based on in vitro protein–DNA interactions. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), 1466-1473. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.082>
- King, J. M. H., DiGrazia, P. M., Applegate, B., Burlage, R., Sanseverino, J., Dunbar, P., . . . Sayler, G. S. (1990). Rapid, Sensitive Bioluminescent Reporter Technology for Naphthalene Exposure and Biodegradation. *Science*, 249(4970), 778-781. doi: 10.2307/2878083
- Knight, T. (2003). Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. *MIT Artificial Intelligence Laboratory; MIT Synthetic Biology Working Group*.
- Kostal, J., Yang, R., Wu, C. H., Mulchandani, A., & Chen, W. (2004). Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. *Appl Environ Microbiol*, 70(8), 4582-4587. doi: 10.1128/AEM.70.8.4582-4587.2004

- Latorre, S. M. (2014). *Búsqueda de genes de resistencia a arsénico en el metagenoma microbiano de la Sabana de Bogotá*. Magister en Ciencias- Microbiología, Universidad Nacional de Colombia.
- Lewis, J. C., Feltus, A., Ensor, C. M., Ramanathan, S., & Daunert, S. (1998). Applications of reporter genes. *Anal Chem*, 70(17), 579A-585A.
- Liao, V. H.-C., & Ou, K.-L. (2005). Development and testing of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for measuring bioavailable arsenic in contaminated groundwater samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7), 1624-1631. doi: 10.1897/04-500r.1
- Liao, V. H., & Ou, K. L. (2005). Development and testing of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for measuring bioavailable arsenic in contaminated groundwater samples. *Environ Toxicol Chem*, 24(7), 1624-1631.
- Litter. (2009). Metodologías analíticas para la detección de arsénico en aguas y suelos.
- Litter, M. I., Morgada, M. E., & Bundschuh, J. (2010). Possible treatments for arsenic removal in Latin American waters for human consumption. *Environ Pollut*, 158(5), 1105-1118. doi: 10.1016/j.envpol.2010.01.028
- Liu, Z., Mukhopadhyay, R., Shi, J., Ye, J., & Rosen, B. P. (2003). Chapter 18 - Structural proteomics of arsenic transport and detoxification. *Arsenic Exposure and Health Effects V* (pp. 241-253). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Lukyanov, K. A., Fradkov, A. F., Gurskaya, N. G., Matz, M. V., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Lukyanov, S. A. (2000). Natural Animal Coloration Can Be Determined by a Nonfluorescent Green Fluorescent Protein Homolog. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 25879-25882. doi: 10.1074/jbc.C000338200
- Luong, J. H., Male, K. B., & Glennon, J. D. (2008). Biosensor technology: technology push versus market pull. [Review]. *Biotechnol Adv*, 26(5), 492-500. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.05.007
- Luong, J. H. T., Majid, E., & Male, K. B. (2007). Analytical Tools for Monitoring Arsenic in the Environment. *The Open Analytical Chemistry Journal*, 1(1), 7-14. doi: 10.2174/187406500701017005
- Mandal, B. K., & Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58(1), 201-235. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00268-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00268-0)
- Marchisio, M. A., & Rudolf, F. (2011). Synthetic biosensing systems. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(3), 310-319. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2010.11.012>
- Marín. (1978). *Recursos minerales de colombia*.
- McLaren, K. (1976). XIII—The Development of the CIE 1976 (L* a* b*) Uniform Colour Space and Colour-difference Formula. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 92(9), 338-341. doi: 10.1111/j.1478-4408.1976.tb03301.x
- MERCOSUR. (2013). El problema del arsénico en el Mercosur. Un abordaje integrado y multidisciplinar en la investigación y desarrollo para contribuir a su resolución. Retrieved 14 de marzo 2014, from http://www.cytel.org/documentos/noticias/doc_28.pdf
- Merulla, D., Buffi, N., Beggah, S., Truffer, F., Geiser, M., Renaud, P., & van der Meer, J. R. (2013). Bioreporters and biosensors for arsenic detection. Biotechnological solutions for a world-wide pollution problem. *Curr Opin Biotechnol*, 24(3), 534-541. doi: 10.1016/j.copbio.2012.09.002
- Resolución 2115 (2007).

- Miraglia, L. J., King, F. J., & Damoiseaux, R. (2011). Seeing the light: Luminescent reporter gene assays. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 14(8), 648-657. doi: 10.2174/138620711796504389
- Miyawaki, A., Shcherbakova, D. M., & Verkhusha, V. V. (2012). Red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(5), 679-688. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2012.09.002>
- Morin, J. G., & Hastings, J. W. (1971). Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J Cell Physiol*, 77(3), 305-312. doi: 10.1002/jcp.1040770304
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Phung, L. T., & Silver, S. (2002). Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev*, 26(3), 311-325.
- Muller, D., Lièvreumont, D., Simeonova, D. D., Hubert, J.-C., & Lett, M.-C. (2003). Arsenite Oxidase aox Genes from a Metal-Resistant β -Proteobacterium. *J Bacteriol*, 185(1), 135-141. doi: 10.1128/jb.185.1.135-141.2003
- Muñoz, E. J. (2008). *Determinación de arsénico por técnicas de absorción atómica en vegetales, suelos y aguas de riego*. Universidad Nacional de Colombia.
- Naylor, L. H. (1999). Reporter gene technology: the future looks bright. [Review]. *Biochem Pharmacol*, 58(5), 749-757.
- Ng, J. C., Wang, J., & Shraim, A. (2003). A global health problem caused by arsenic from natural sources. [Review]. *Chemosphere*, 52(9), 1353-1359. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00470-3
- Nicolli, H. B. (2006). Arsénico en aguas subterráneas de Latinoamérica: panorama y perspectivas. CONICET, Buenos Aires.: Instituto de Geoquímica, Centro de Investigaciones San Miguel.
- Nordstrom, D. K. (2002). Worldwide Occurrences of Arsenic in Ground Water. *Science*, 296(5576), 2143-2145. doi: 10.1126/science.1072375
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, 302(1), 205-217. doi: 10.1006/jmbi.2000.4042
- Paez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V., & Canovas, D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic *Biometals*, 22(1), 117-130. doi: 10.1007/s10534-008-9195-y
- Park, M., Tsai, S.-L., & Chen, W. (2013). Microbial Biosensors: Engineered Microorganisms as the Sensing Machinery. *Sensors*, 13(5), 5777-5795.
- Petänen, T., & Romantschuk, M. (2002). Use of bioluminescent bacterial sensors as an alternative method for measuring heavy metals in soil extracts. *Analytica Chimica Acta*, 456(1), 55-61. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00963-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00963-1)
- Petrusevsky. (2007). Arsenic in drinking water. In S. S (Ed.).
- Preston, S., Coad, N., Townend, J., Killham, K., & Paton, G. I. (2000). Biosensing the acute toxicity of metal interactions: Are they additive, synergistic, or antagonistic? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(3), 775-780. doi: 10.1002/etc.5620190332
- Ramanathan, S., Shi, W., Rosen, B. P., & Daunert, S. (1997). Sensing Antimonite and Arsenite at the Subattomole Level with Genetically Engineered Bioluminescent Bacteria. *Anal Chem*, 69(16), 3380-3384.
- Ramanathan, S., Shi, W., Rosen, B. P., & Daunert, S. (1998). Bacteria-based chemiluminescence sensing system using β -galactosidase under the control of the ArsR regulatory protein of the ars operon. *Analytica Chimica Acta*, 369(3), 189-195. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00244-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00244-X)

- Ranjan, R., Rastogi, N. K., & Thakur, M. S. (2012). Development of immobilized biophotonic beads consisting of *Photobacterium leiognathi* for the detection of heavy metals and pesticide. *Journal of Hazardous Materials*, 225–226(0), 114–123. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.076>
- Ravenscroft, P. (2007). Predicting the global extent of arsenic pollution of groundwater and its potential impact on human health. Final report. New York: UNICEF.
- RegPrecise. (2009– 2015). Collection of Manually Curated Inferences of Regulons in Prokaryotic Genomes. <http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/help.jsp#what>
- Remington, S. J. (2006). Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(6), 714–721. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2006.10.001>
- Roberto, F. F., Barnes, J. M., & Bruhn, D. F. (2002). Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. *Talanta*, 58(1), 181–188.
- Rogers, K. R. (1995). Biosensors for environmental applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(6–7), 533–541. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)96929-S](http://dx.doi.org/10.1016/0956-5663(95)96929-S)
- Ronderos, M. T. (2011). La fiebre minera se apodero de colombia. *Semana*.
- Rosen, B. P. (1999). Families of arsenic transporters. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Trends Microbiol*, 7(5), 207–212.
- Rosenstein, R., Nikoleit, K., & Götz, F. (1994). Binding of ArsR, the repressor of the *Staphylococcus xylosus* (pSX267) arsenic resistance operon to a sequence with dyad symmetry within the ars promoter. *Molecular and General Genetics MGG*, 242(5), 566–572. doi: 10.1007/bf00285280
- Salaün, P., Gibbon-Walsh, K. B., Alves, G. M. S., Soares, H. M. V. M., & van den Berg, C. M. G. (2012). Determination of arsenic and antimony in seawater by voltammetric and chronopotentiometric stripping using a vibrated gold microwire electrode. *Analytica Chimica Acta*, 746(0), 53–62. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.08.013>
- Saltikov, C. W., & Olson, B. H. (2002). Homology of *Escherichia coli* R773 arsA, arsB, and arsC Genes in Arsenic-Resistant Bacteria Isolated from Raw Sewage and Arsenic-Enriched Creek Waters. *Appl Environ Microbiol*, 68(1), 280–288. doi: 10.1128/aem.68.1.280-288.2002
- Sambrook, J. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. In D. W. Russell (Ed.), (3rd ed. ed.). Cold Spring Harbor, N.Y. :: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Francisco, M. J., Hope, C. L., Owolabi, J. B., Tisa, L. S., & Rosen, B. P. (1990). Identification of the metalloreulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acids Res*, 18(3), 619–624.
- Sayler, G., Cox, C., Burlage, R., Ripp, S., Nivens, D., Werner, C. Matrubutham, U. (1999). Field Application of a Genetically Engineered Microorganism for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Bioremediation Process Monitoring and Control. In R. Fass, Y. Flashner & S. Reuveny (Eds.), *Novel Approaches for Bioremediation of Organic Pollution* (pp. 241–254): Springer US.
- Scott, D. L., Ramanathan, S., Shi, W., Rosen, B. P., & Daunert, S. (1997). Genetically Engineered Bacteria: Electrochemical Sensing Systems for Antimonite and Arsenite. *Anal Chem*, 69(1), 16–20. doi: 10.1021/ac960788x
- Schäfer, L. V., Groenhof, G., Boggio-Pasqua, M., Robb, M. A., & Grubmüller, H. (2008). Chromophore Protonation State Controls Photoswitching of the Fluoroprotein asFP595. *PLoS Computational Biology*, 4(3), e1000034. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000034

- Scharnagl, C., Raupp-Kossmann, R., & Fischer, S. F. (1999). Molecular basis for pH sensitivity and proton transfer in green fluorescent protein: protonation and conformational substates from electrostatic calculations. *Biophysical Journal*, 77(4), 1839-1857.
- Sengupta, M. K., & Dasgupta, P. K. (2009). An Automated Hydride Generation Interface to ICPMS for Measuring Total Arsenic in Environmental Samples. *Anal Chem*, 81(23), 9737-9743. doi: 10.1021/ac9020243
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. [10.1038/nbt1037]. *Nat Biotech*, 22(12), 1567-1572. doi: http://www.nature.com/nbt/journal/v22/n12/supinfo/nbt1037_S1.html
- Sharma, P., Asad, S., & Ali, A. (2013). Bioluminescent bioreporter for assessment of arsenic contamination in water samples of India. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biosci*, 38(2), 251-258.
- Shen, S., Li, X.-F., Cullen, W. R., Weinfeld, M., & Le, X. C. (2013). Arsenic Binding to Proteins. *Chemical Reviews*, 113(10), 7769-7792. doi: 10.1021/cr300015c
- Siddiki, M. S. R., Kawakami, Y., Ueda, S., & Maeda, I. (2011). Solid Phase Biosensors for Arsenic or Cadmium Composed of A trans Factor and cis Element Complex. *Sensors*, 11(11), 10063-10073.
- Siegfried, K., Endes, C., Bhuiyan, A. F. M. K., Kuppardt, A., Mattusch, J., van der Meer, J. R., . . . Harms, H. (2012). Field Testing of Arsenic in Groundwater Samples of Bangladesh Using a Test Kit Based on Lyophilized Bioreporter Bacteria. *Environ Sci Technol*, 46(6), 3281-3287. doi: 10.1021/es203511k
- Silver, S., Budd, K., Leahy, K. M., Shaw, W. V., Hammond, D., Novick, R. P., Rosenberg, H. (1981). Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 146(3), 983-996.
- Silver, S., Ji, G., Bröer, S., Dey, S., Dou, D., & Rosen, B. P. (1993). Orphan enzyme or patriarch of a new tribe: the arsenic resistance ATPase of bacterial plasmids. *Molecular Microbiology*, 8(4), 637-642. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01607.x
- Silver, S., & Phung le, T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. [Review]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32(11-12), 587-605. doi: 10.1007/s10295-005-0019-6
- Smith, A. H., & Smith, M. M. H. (2004). Arsenic drinking water regulations in developing countries with extensive exposure. *Toxicology*, 198(1-3), 39-44. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.024>
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., & Painter, P. R. (2005). *Microbiología*.
- Stocker, J., Balluch, D., Gsell, M., Harms, H., Feliciano, J., Daunert, S., van der Meer, J. R. (2003). Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ Sci Technol*, 37(20), 4743-4750.
- Stolz, J. F., Basu, P., Santini, J. M., & Oremland, R. S. (2006). Arsenic and selenium in microbial metabolism. [Review]. *Annu Rev Microbiol*, 60, 107-130. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142053
- Stolz, J. F., & Oremland, R. S. (2011). *Microbial Metal and Metalloid Metabolism: Advances and Applications*: ASM Press.
- Su, L., Jia, W., Hou, C., & Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1788-1799. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.005>

- Summers, A. O. (1992). Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol*, 174(10), 3097-3101.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Tani, C., Inoue, K., Tani, Y., Harun-ur-Rashid, M., Azuma, N., Ueda, S., Maeda, I. (2009). Sensitive fluorescent microplate bioassay using recombinant Escherichia coli with multiple promoter-reporter units in tandem for detection of arsenic. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(5), 414-420. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.05.014>
- Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W., & Virta, M. (1997). Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Appl Environ Microbiol*, 63(11), 4456-4461.
- Tauriainen, S., Virta, M., Chang, W., & Karp, M. (1999). Measurement of Firefly Luciferase Reporter Gene Activity from Cells and Lysates Using Escherichia coli Arsenite and Mercury Sensors. *Analytical Biochemistry*, 272(2), 191-198. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1999.4193>
- Torres, J. M., P. (2008). *Recuperación de cepas tolerantes a concentraciones de arsénico.*, Universidad Nacional de Colombia.
- Trang, P. T. K., Berg, M., Viet, P. H., Mui, N. V., & van der Meer, J. R. (2005). Bacterial Bioassay for Rapid and Accurate Analysis of Arsenic in Highly Variable Groundwater Samples. *Environ Sci Technol*, 39(19), 7625-7630. doi: 10.1021/es050992e
- Tsai, S. L., Singh, S., & Chen, W. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Curr Opin Biotechnol*, 20(6), 659-667. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.013
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509-544. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*, 35(Web Server issue), W71-W74. doi: 10.1093/nar/gkm306
- van der Meer, J. R., & Belkin, S. (2010). Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. [Review]. *Nat Rev Micro*, 8(7), 511-522. doi: 10.1038/nrmicro2392
- Van Dyk, T. K., Majarian, W. R., Konstantinov, K. B., Young, R. M., Dhurjati, P. S., & LaRossa, R. A. (1994). Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl Environ Microbiol*, 60(5), 1414-1420.
- Verkhusha, V. V., Chudakov, D. M., Gurskaya, N. G., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2004). Common Pathway for the Red Chromophore Formation in Fluorescent Proteins and Chromoproteins. *Chemistry & Biology*, 11(6), 845-854. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.04.007>
- Verkhusha, V. V., & Lukyanov, K. A. (2004). The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotech*, 22(3), 289-296.
- Wackwitz, A., Harms, H., Chatzinotas, A., Breuer, U., Vogne, C., & Van Der Meer, J. R. (2008). Internal arsenite bioassay calibration using multiple bioreporter cell lines. *Microbial Biotechnology*, 1(2), 149-157. doi: 10.1111/j.1751-7915.2007.00011.x

- Wachter, R. M. (2006). The Family of GFP-Like Proteins: Structure, Function, Photophysics and Biosensor Applications. Introduction and Perspective. *Photochemistry and Photobiology*, 82(2), 339-344. doi: 10.1562/2005-10-02-ir-708
- Wang, B., Barahona, M., & Buck, M. (2013). A modular cell-based biosensor using engineered genetic logic circuits to detect and integrate multiple environmental signals. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 368-376. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.011>
- Weber, W., & Fussenegger, M. (2011). Molecular diversity—the toolbox for synthetic gene switches and networks. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(3), 414-420. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.03.003>
- Wilmann, P. G., Petersen, J., Devenish, R. J., Prescott, M., & Rossjohn, J. (2005). Variations on the GFP Chromophore: a polypeptide fragmentation within the chromophore revealed in the 2.1-Å crystal structure of a nonfluorescent chromoprotein from anemonia sulcata. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2401-2404. doi: 10.1074/jbc.C400484200
- Wokittel. (1960). Compilación de los estudios geológicos oficiales en Colombia. (Vol. 10). Bogotá.
- Wood, K. V. (1995). Marker proteins for gene expression. *Curr Opin Biotechnol*, 6(1), 50-58. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80009-3](http://dx.doi.org/10.1016/0958-1669(95)80009-3)
- Wu, J., & Rosen, B. P. (1991). The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein. *Molecular Microbiology*, 5(6), 1331-1336.
- Wu, J., & Rosen, B. P. (1993). The arsD gene encodes a second trans-acting regulatory protein of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Molecular Microbiology*, 8(3), 615-623. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01605.x
- Wu, J., & Rosen, B. P. (1993). Metalloregulated expression of the ars operon. *J Biol Chem*, 268(1), 52-58.
- Xu, C., & Rosen, B. P. (1997). Dimerization is essential for DNA binding and repression by the ArsR metalloregulatory protein of Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), 15734-15738. doi: 10.1074/jbc.272.25.15734
- Xu, C., Shi, W., & Rosen, B. P. (1996). The Chromosomal arsR Gene of Escherichia coli Encodes a trans-acting Metalloregulatory Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), 2427-2432. doi: 10.1074/jbc.271.5.2427
- Yagi, K. (2007). Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. [Review]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(6), 1251-1258. doi: 10.1007/s00253-006-0718-6
- Yoshida, K., Inoue, K., Takahashi, Y., Ueda, S., Isoda, K., Yagi, K., & Maeda, I. (2008). Novel carotenoid-based biosensor for simple visual detection of arsenite: characterization and preliminary evaluation for environmental application. *Appl Environ Microbiol*, 74(21), 6730-6738. doi: 10.1128/AEM.00498-08
- Yunus, M., Sohel, N., Hore, S. K., & Rahman, M. (2011). Arsenic exposure and adverse health effects: a review of recent findings from arsenic and health studies in Matlab, Bangladesh. *Kaohsiung J Med Sci*, 27(9), 371-376. doi: 10.1016/j.kjms.2011.05.012
- Zhang, J. Y., Zheng, C. G., Ren, D. Y., Chou, C. L., Liu, J., Zeng, R. S., Ge, Y. T. (2004). Distribution of potentially hazardous trace elements in coals from Shanxi province, China. *Fuel*, 83(1), 129-135. doi: 10.1016/s0016-2361(03)00221-7
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2), 203-214. doi: 10.1089/10665270050081478